



HAL
open science

Identification des facteurs déterminant le ciblage de la recombinaison méiotique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Robin Michard

► To cite this version:

Robin Michard. Identification des facteurs déterminant le ciblage de la recombinaison méiotique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Clermont Auvergne (UCA), Clermont-Ferrand, FRA., 2019. Français. NNT: . tel-04622150

HAL Id: tel-04622150

<https://hal.science/tel-04622150>

Submitted on 24 Jun 2024

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.

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de
Docteur D'université (option Biologie végétale) et soutenue par

Robin MICHARD

Identification des facteurs déterminant le ciblage de la recombinaison méiotique
chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Sous la direction de Pierre Sourdille

le 16/05/2019

Rapporteurs : Anne-Marie Chèvre (DR INRA)
Peter Rogowsky (DR INRA)

Examineurs : Oumaya Bouchabké-Coussa (IR INRA)
Maria Eugenia Gallego (PR1 UCA)
Alain Nicolas (DR Institut Curie)
Pierre Sourdille (DR INRA, directeur de thèse)

*Pour réaliser une chose vraiment extraordinaire, commencez par la rêver.
Ensuite, réveillez-vous calmement et allez d'un trait jusqu'au bout de votre rêve,
Sans jamais vous laisser décourager.*

Walt Disney

Résumé

La compréhension des mécanismes régissant la recombinaison méiotique chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) devient essentielle puisqu'elle est le levier principal utilisé par les sélectionneurs pour le brassage génétique et obtenir de nouvelles variétés élités comportant des introgressions de régions d'intérêt provenant de ressources génétiques exotiques. A cette fin, l'utilisation chez le blé tendre d'une nouvelle biotechnologie de ciblage de la recombinaison méiotique développée chez la levure par la société Meiogenix semble être prometteuse. Cette biotechnologie, nommée SpiX, fait intervenir un domaine protéique de liaison à l'ADN couplé à la protéine SPO11 responsable des cassures double-brins de l'ADN, initiateurs de la recombinaison méiotique ou crossovers (CO). Le développement d'une nouvelle technique de conservation des embryons immatures a permis d'améliorer les conditions de transformation par biolistique du blé tendre pour l'application de la technologie SpiX. L'exploitation de la séquence du génome du blé a permis d'isoler les gènes codant pour les protéines SPO11 du blé tendre. La complémentation hétérologue inédite de mutants pour les protéines SPO11 d'*Arabidopsis thaliana* avec les orthologues ainsi découverts chez le blé tendre montre leur grande conservation de séquence et de fonction au sein des plantes et leur potentielle fonctionnalité pour la biotechnologie SpiX. Enfin le test de différents domaines de liaison à l'ADN et de différentes cibles le long du chromosome 3B de blé tendre montre que la biotechnologie SpiX requiert des ajustements en fonction de l'espèce chez laquelle celle-ci doit fonctionner. Ces résultats sont ainsi l'opportunité de lever un premier voile sur le ciblage de la recombinaison méiotique chez une espèce de grande culture et de mieux comprendre les mécanismes de détermination des sites de cassures double-brin initiateurs de la recombinaison méiotique chez le blé tendre.

Mots clés : ciblage ; recombinaison ; méiose ; *Triticum aestivum* ; SPO11 ; transgénèse ; biotechnologie.

Abstract

Understanding the mechanisms governing meiotic recombination in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is essential since it is the main tool used by breeders for genetic admixing and obtaining new elite varieties with introgression of regions of interest from exotic genetic resources. To this end, the use in bread wheat of a new biotechnology targeting meiotic recombination developed in yeast by Meiogenix seems to be promising. This biotechnology, named SpiX, involves a DNA-binding domain fused to the SPO11 protein responsible for DNA double-strand breaks, initiating meiotic recombination or crossovers (CO). The development of a new conservation protocol for wheat immature embryos has improved the conditions for bread wheat transformation through biolistic, and thus for the application of SpiX technology. The exploitation of the wheat genome sequence made it possible to isolate the bread wheat genes for SPO11 proteins. A novel heterologous complementation of *Arabidopsis thaliana* mutants for SPO11s with the bread wheat orthologous freshly discovered shows their great conservation of sequence and function within plants and their potential functionality for SpiX biotechnology. Finally, the testing of different DNA-binding domains and different targets along bread wheat 3B chromosome shows that SpiX biotechnology requires adjustments depending on the species in which it has to function. These results are the opportunity to uncover the targeting of meiotic recombination in a widely cultivated crop species and to understand the mechanisms determining sites for double-strand break prior to meiotic recombination in wheat.

Keywords: targeting; recombination; meiosis; *Triticum aestivum*; SPO11; transgenesis; biotechnology.

TABLE DES MATIERES

1	Introduction	4
2	Etude bibliographique	10
2.1	Divisions cellulaires	10
2.1.1	La mitose	10
2.1.2	La méiose	12
2.2	La recombinaison méiotique	18
2.2.1	Généralités.....	18
2.2.2	Facteurs impactant la recombinaison	24
2.3	Les acteurs de la recombinaison	40
2.3.1	Formation des cassures double-brinss.....	40
2.3.2	Traitement des cassures double-brinss et choix de modèle homologue.....	42
2.4	Modification et amélioration de la recombinaison	60
2.4.1	Agir sur la méthylation.....	60
2.4.2	Bloquer la voie des NCO et réduire l'interférence.....	62
2.4.3	Le ciblage de la recombinaison	62
2.5	SPO11, un acteur majeur de la technologie SpiX	78
2.5.1	Phylogénie	78
2.5.2	Organisation fonctionnelle et partenaires.....	80
2.6	La polyploïdie.....	84
2.6.1	Généralités.....	84
2.6.2	L'autopolyploïdie	88
2.6.3	L'allopolyplôïdie.....	90
2.6.4	Contraintes liées à la Polyplôïdie	90
2.6.5	Cas du Blé tendre, espèce polyplôïde modèle.....	94
2.7	Objectifs de la thèse.....	104
3	Matériels et Méthodes	112
3.1	Découverte des orthologues de SPO11 chez le blé tendre et clonage	112
3.2	Complémentation d'un mutant d' <i>Arabidopsis</i> par le gène orthologue chez le blé tendre...	116
3.2.1	Matériel végétal et conditions de culture	116
3.2.2	Obtention de séquences des protéines SPO11-1 multi-espèces et phylogénie.....	118
3.2.3	Etalements de chromosomes méiotiques mâles	118

3.2.4	Microscopie.....	120
3.2.5	Analyses statistiques	120
3.3	Recherche de cibles pour la technologie SpiX le long du chromosome 3B.....	120
3.3.1	Définition des zones cibles sur le chromosomes 3B.....	120
3.3.2	Définition des cibles au sein des zones déterminées sur le chromosomes 3B pour les différentes technologies de liaison à l'ADN (TAL et CRISPR).....	126
3.4	Elaboration des constructions plasmidiques.....	130
3.4.1	Construction des vecteurs plasmidiques	130
3.4.2	Constructions réalisées	132
3.4.3	Vérification et production des vecteurs plasmidiques.....	134
3.4.4	Production de la cassette plasmidique pour la transformation par biolistique.....	138
3.5	Culture des plantes.....	138
3.6	Production d'embryons hybrides.....	140
3.7	Génération des plantes transgéniques.....	144
3.7.1	Extraction des embryons	144
3.7.2	Biolistique	144
3.7.3	Culture <i>in vitro</i>	146
3.7.4	Criblage PCR et culture en serre S2.....	148
3.7.5	Récolte des grains T1	150
3.8	Génotypage des populations T1	152
3.8.1	Stratégie.....	154
3.8.2	Recherche de marqueurs	154
3.8.3	Protocole.....	156
3.8.4	Lecture et analyse des résultats	156
4	Résultats	160
4.1	Embryons immatures et Culture <i>in vitro</i>	160
4.1.1	Production des embryons immatures	160
4.1.2	Conservation de grains hybrides immatures pour la biolistique	162
4.1.3	Résultats de la transformation des embryons immatures et plantes T0	180
4.2	Les orthologues de SPO11 chez le blé tendre	184
4.2.1	Détermination des CDS et protéines	184
4.2.2	Organisation et conservation des gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre.....	186
4.2.3	Conservation de la protéine SPO11-1 au sein du règne végétal.....	188
4.2.4	Domaines parfaitement conservés entre le blé et <i>Arabidopsis</i> pour la protéine SPO11-1.....	190

4.2.5	Epissage.....	182
4.2.6	Complémentation hétérologue de mutants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2 par les gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre.....	186
4.3	La technologie Spix appliquée au Blé tendre	210
4.3.1	Ciblage sur le chromosome 3B	210
4.3.2	Zoom sur le promoteur UBI	218
4.4	Efficacité de la technologie SpiX sur le blé tendre	222
4.4.1	Ciblage de la technologie SpiX.....	222
4.4.2	Production et génotypage de la descendance T1	224
5	Discussion et Perspectives	234
5.1	Embryons immatures et Culture <i>in vitro</i>	234
5.1.1	Mise en pause de la croissance des embryons.....	236
5.1.2	Le stockage au froid préserve la capacité embryogénique des embryons immatures 118	
5.1.3	Transformation d'embryons hybrides	238
5.2	SPO11 chez le blé tendre.....	248
5.2.1	Orthologie.....	248
5.2.2	Complémentation hétérologue et conservation de fonction	250
5.2.3	Epissage alternatif	254
5.3	Application et efficacité de la technologie SpiX chez le blé tendre	260
5.3.1	Les cibles.....	260
5.3.2	Le ciblage	260
5.3.3	Le promoteur UBI	266
5.3.4	Génotypage des populations T1 SpiX.....	268
6	Conclusion.....	276
7	Références	282
8	Annexes.....	316



A stylized yellow wheat stalk graphic is positioned diagonally across the page, starting from the bottom left and extending towards the top right. The stalk is composed of a long, pointed leaf-like base and a cluster of wheat heads at the top. The wheat heads are detailed with individual grains and are arranged in a vertical line. The entire graphic is rendered in a bright yellow color.

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION


Il y a environ 12 000 ans, une nouvelle aire des peuples humains a vu le jour, passant d'une vie nomade à une vie sédentaire grâce à la naissance des pratiques agricoles et de l'élevage (1, 2). Cette domestication nouvelle des plantes et des animaux, en plus d'avoir un effet sur les populations humaines, a eu également un effet sur les organismes domestiqués. Chez les plantes par exemple, de nombreuses modifications morphologiques essentielles aux pratiques agricoles ont pris le pas sur les caractéristiques ancestrales. Parmi elles sont souvent décrites des modifications de la taille et du nombre de grains (1-3). Il se pourrait que la domestication ait eu un impact sur l'apparition d'espèces polyploïdes, celle-ci n'existant qu'à l'état cultivées (blé tendre, colza) (4, 5). D'ailleurs, de nos jours, une grande partie des plantes cultivées est polyploïde (6). Cependant la domestication des plantes et les pratiques agricoles n'ont pas eu que des effets bénéfiques. On note qu'au fil du temps, de par l'utilisation d'un nombre limité d'individus pour la multiplication et l'élaboration de nouvelles variétés cultivées, nous faisons face à un appauvrissement du pool génétique et avons atteint un goulot d'étranglement (2, 3, 7, 8). En ne sélectionnant que les individus les plus intéressants pour l'agriculture intensive, nous avons contribué en même temps à cet appauvrissement de la diversité génétique (9, 10). Les grandes espèces cultivées comme le maïs, le riz, le colza et le blé tendre ne font pas exception à la règle. Alors que la FAO (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) prévoit que la Terre sera foulée par plus de 9 milliards d'individus en 2050, il existe un besoin vital de pouvoir répondre à la future augmentation de la demande alimentaire. Les rendements devront augmenter de 60% par rapport aux rendements de 2005-2007 (10). Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), qui fait partie du groupe monophylétique des monocotylédones (aussi appelé super-ordre des *Lilianaes*) et de la famille des *Poaceae*, est une plante annuelle cultivée sur environ 220 millions d'hectares (ce qui équivaut à la superficie de 3



Diversité des épis de blé tendre (Copyright : INRA)

fois la France). Elle est l'une des trois céréales les plus cultivées au monde devant le maïs et le riz (FAOSTAT 2016). Le blé tendre représente la principale source calorique pour l'alimentation humaine (environ 20%) et sa production mondiale atteignait environ 750 millions de tonnes en 2016 (29Mt pour la France, 6^{ème} rang mondial). Jusqu'alors, Le stratagème utilisé pour répondre à l'augmentation de la demande consistait à augmenter les surfaces arables. Il devient évident que face à l'augmentation de la population et de fait, face à la flambée de l'urbanisation, ce stratagème arrive à bout de souffle. Se rajoute, en plus, l'impérative nécessité de diminuer notre utilisation d'intrants dans le modèles de cultures (engrais, pesticides, fongicides, eau). Nous devons tendre vers un système plus durable et permettant de protéger l'environnement des pollutions engendrées par nos méthodes actuelles. Pour cela nous devons trouver le moyen d'accélérer l'adaptation des plantes de grandes cultures pour répondre aux nouvelles demandes et aux nouvelles conditions climatiques et environnementales. Il existe de nombreuses stratégies permettant l'accélération de la création variétale. Cependant elles sont étroitement liées à la disponibilité des ressources génétiques et la capacité à pouvoir insérer uniquement les caractères d'intérêt dans un nouveau génotype. Cette insertion n'est pas toujours chose facile. De nos jours, de nouvelles techniques d'édition des génomes permettent de répondre simplement à cette problématique mais celle-ci restent soumises à une législation fluctuante et inégale en fonction des pays. Un autre moyen serait de manipuler et contrôler les mécanismes naturels du brassage génétique comme la recombinaison pour pouvoir introgresser de nouveaux allèles exotiques dans des variétés élites. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte particulier et, en s'appuyant sur la biotechnologie SpiX développée par la société Meigenix, ont pour objectif de contribuer à la compréhension du ciblage de la recombinaison méiotique chez une espèce de grande culture ayant un intérêt socio-économique mondial indéniable : le blé tendre.





**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

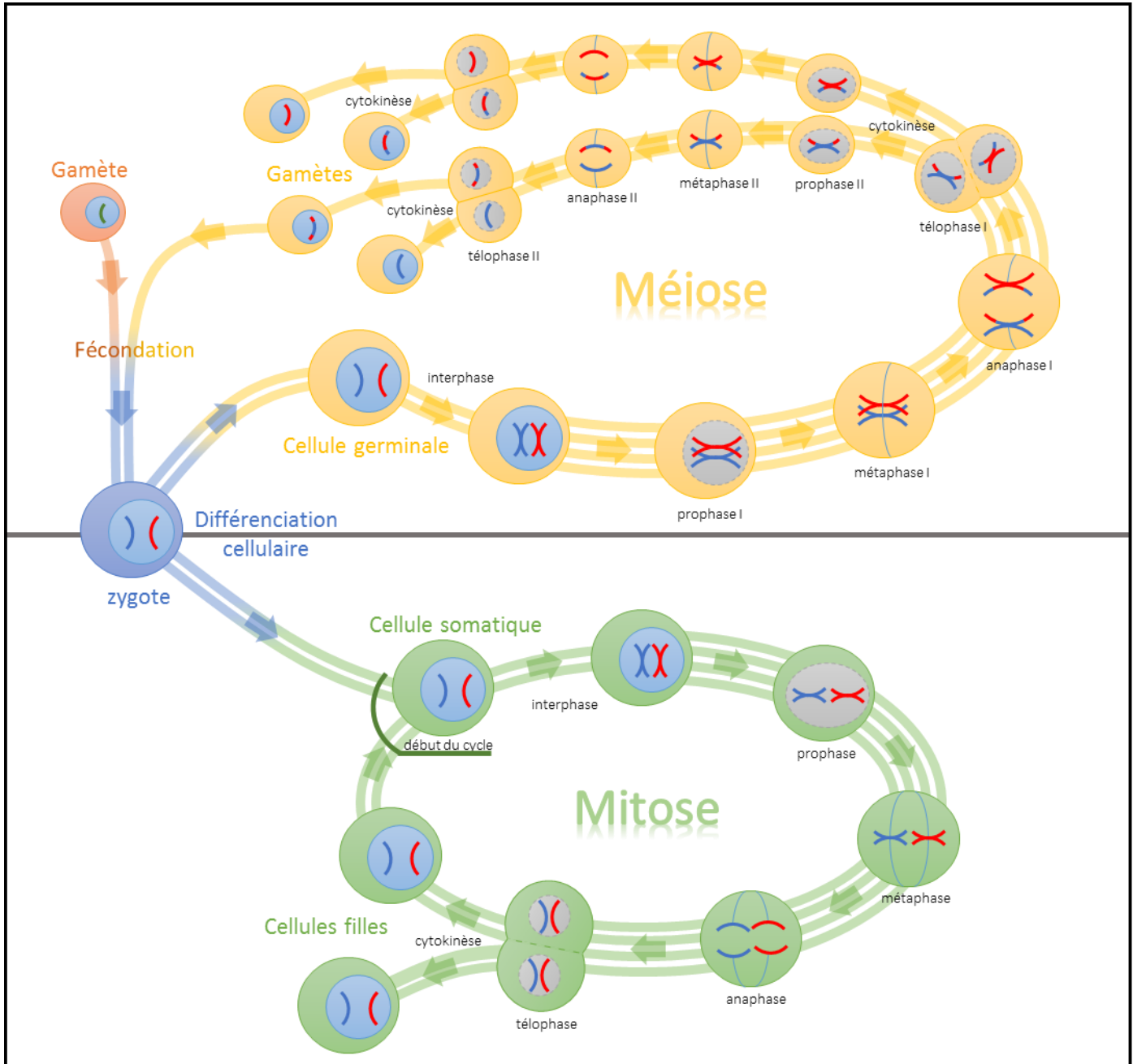


Figure 1 : Mitose et Méiose, deux divisions cellulaires régissant le vivant. Alors que la mitose se déroule sous forme d'un cycle, la méiose, elle, a un début et une fin. La mitose est composée d'un cycle de 4 étapes (prophase, métaphase, anaphase et télaphase) suivant une interphase et se terminant par une étape de cytokinèse. Cette division donne naissance à deux cellules filles identiques à la cellule somatique mère. La méiose est divisée en deux parties, la méiose I et la méiose II, chacune composée d'une suite de 4 étapes (prophase I, métaphase I, anaphase I, télaphase I, prophase II, métaphase II, anaphase II et télaphase II). Chaque suite d'étapes est précédée par une interphase et terminée par une cytokinèse. La méiose permet la formation de quatre gamètes haploïde (1c) à partir d'une cellule germinale mère. Chaque cellule est représentée avec une paire de chromosomes homologues et le nombre de ligne reliant chaque étape représente le nombre c de chromatide par paire de chromosome homologue)

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Divisions cellulaires

2.1.1 La mitose

Le cycle cellulaire d'un eucaryote est dominé par une division, la mitose (Figure 1). Par convention, nous notons n le nombre de chromosomes hétérologues (portant des informations génétiques différentes) et C le nombre de chromatides par chromosome. Ainsi une cellule diploïde possédant deux chromatides par chromosome est noté $2n, 2C$. La mitose est composée de quatre étapes qui, à partir d'une cellule mère, donnent deux cellules filles identiques à la cellule mère ($2n, 2C$ donne 2 fois $2n, 2C$, Figure 1). Ces quatre étapes sont : La prophase, durant laquelle la cellule se prépare pour la division en désintégrant l'enveloppe nucléaire, en condensant les chromosomes et en initiant l'anneau mitotique ; La métaphase voit les chromosomes s'aligner par le centrosome au centre de la cellule le long de la plaque métaphasique (structure imaginaire localisé au centre de la cellule) ; L'anaphase consiste en la séparation des chromatides de chaque chromosome, de part et d'autre de la cellule, de manière à les répartir de façon strictement égale ; Enfin la télophase est la réversion des évènements de prophase et de métaphase afin de reformer deux noyaux au sein de la cellule. Cette dernière étape peut être suivie d'un autre mécanisme indépendant de la mitose, la cytokinèse, afin de finaliser la formation des deux cellules filles. Ceci n'est pas obligatoire, comme dans par exemple le cas des cellules plurinucléées.

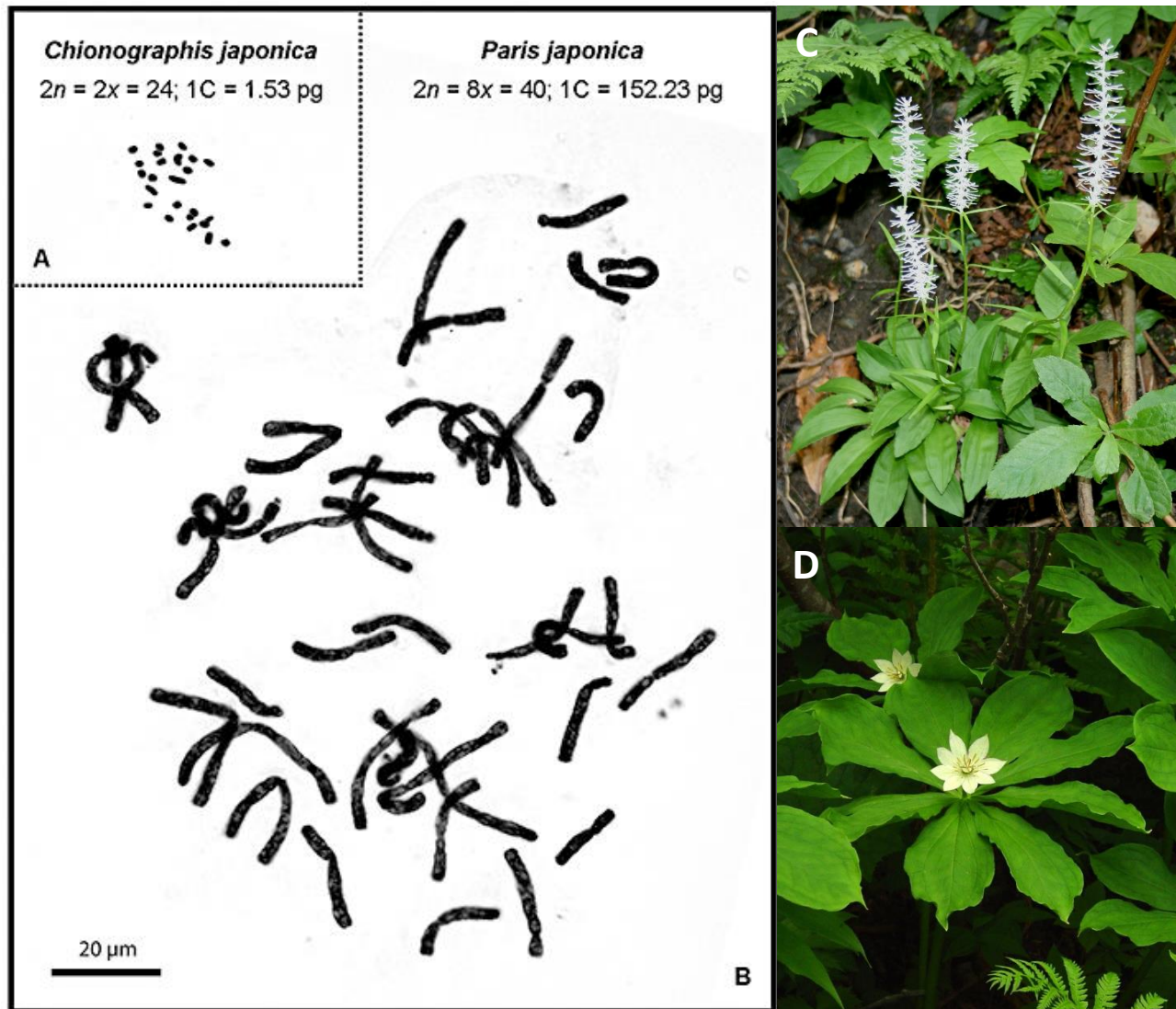


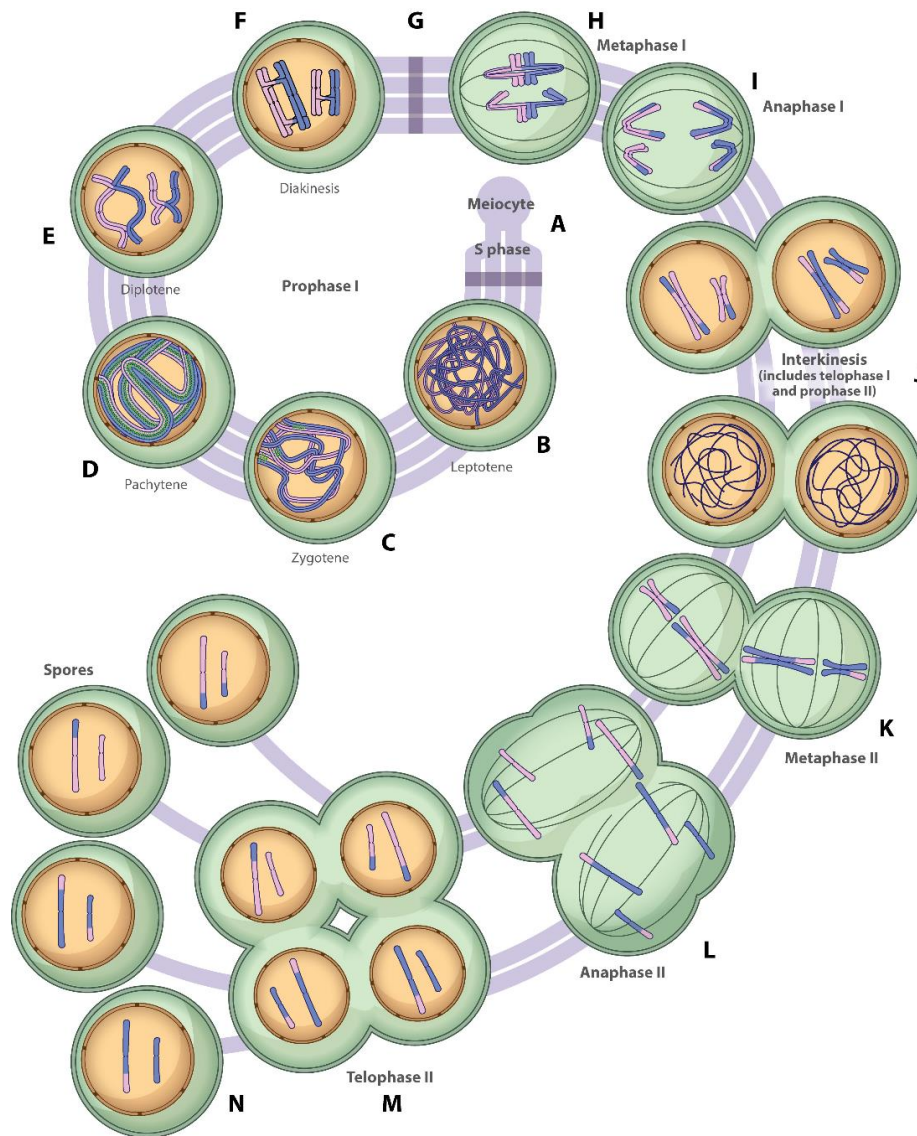
Figure 2 : Le plus grand génome connu chez les plantes. Visualisation du caryotype de deux membres de la famille des Mélanthiacées (plantes monocotylédones de l'ordre des Liliales), (A) *Chionographis japonica* (1,5 Gb) et (B) *Paris japonica* (150 Gb). Cette dernière est connu pour être l'organisme eucaryote possédant le plus grand génome. Les deux images sont au même grossissement. (Pellicer *et al.*, 2010, Photos: Wikipédia)

2.1.2 La méiose

2.1.2.1 Généralités

Au sein du règne eucaryote, la reproduction sexuée occupe une place prédominante et voit la création d'un type cellulaire spécifique : les gamètes, femelles ou mâles créés par la réduction de moitié du nombre de chromosomes durant la méiose (Figure 1). Cette autre division cellulaire particulière qui se met en place est alors une étape essentielle du cycle de vie des organismes à reproduction sexuée.

L'apparition de la méiose a eu lieu tôt dans l'évolution des eucaryotes (11). Des analyses moléculaires, génétiques et phylogénétiques récentes ont montré que le mécanisme de base est largement conservé parmi les différents règnes du vivant mais, néanmoins, des différences significatives existent entre les espèces (11–13). Au cours du début du 20^{ème} siècle, les plantes étaient le fleuron des études méiotiques et ce à plusieurs titres. Leurs grands génomes (*a fortiori* leurs grands chromosomes) les rendent très intéressantes en cytogénétique (Figure 2) (14, 15). L'examen de la méiose implique aussi l'étude de la fertilité et des variations génétiques, représentant de grands enjeux en agronomie. En effet, en plus d'assurer la bonne ségrégation des chromosomes, la recombinaison méiotique permet un brassage génétique de génération en génération, étant à l'origine d'une diversité génétique sur laquelle s'appuie la sélection variétale. Enfin, les plantes convenaient tout particulièrement aux analyses génétiques, en témoigne le développement dans les années 1980 de plusieurs collections de mutants méiotiques chez de nombreux végétaux (maïs, tomate, seigle) (16). Cependant, l'élévation d'*Arabidopsis thaliana* au rang d'espèce modèle à la fin des années 1990 a permis aux scientifiques de combiner les approches cytogénétiques, moléculaires et génétiques. Dernièrement ce sont d'autres espèces comme le riz, le maïs, le colza, l'orge et le blé qui rejoignent l'espèce modèle dans l'amélioration de notre




 Mercier R, et al. 2015. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:297–327

Figure 3 : Vue d'ensemble de la méiose. (A) La phase préméiotique comprend la différenciation des méiocytes et la phase S de la méiose. (B) Au leptotène, les axes des chromosomes se forment et la recombinaison est initiée. (C) Au zygotène, la synapse se produit par la polymérisation du complexe synaptonémal et la recombinaison progresse. (D) Au pachytène, la synapse est complète et la recombinaison progresse. (E) Au diplotène, le complexe synaptonémal se défait. Les chromosomes homologues sont reliés par des crossovers. (F) Lors de la diakinèse, il se produit une condensation chromosomique et les bivalents peuvent être distingués. (G) La prophase I se termine et l'enveloppe nucléaire se décompose. (H) En métaphase I, le fuseau aligne les bivalents sur la plaque métaphasique. (I) À l'anaphase I, la libération de la cohésion des chromatides sœurs permet la migration des chromosomes au niveau des deux pôles. La cohésion péricentromérique est néanmoins protégée. (J) À l'interkinèse, deux noyaux se forment et les chromosomes décondensent brièvement. Cette étape englobe la télophase I et la prophase II. Chez les monocotylédones, la cytokinèse a lieu avant le début de la méiose II; chez les dicotylédones, la cytokinèse ne se produit qu'à la télophase II. (K) À la métaphase II, deux fuseaux se forment qui alignent les chromosomes sur deux plaques métaphasique. (L) À l'anaphase II, les chromatides sœurs se séparent après la libération de la cohésion centromérique. (M) À la télophase II, quatre noyaux se forment. (N) À la cytokinèse, les spores haploïdes sont libérées. (Mercier *et al.*, 2015)

connaissance des mécanismes de la méiose, un processus majeur dont une étape clé est la recombinaison méiotique.

2.1.2.2 Mécanismes

A l'instar de la mitose, la méiose est composée de deux étapes de ségrégation chromosomique qui suivent une unique étape de réplication de l'ADN et ainsi permet à partir d'une cellule mère avec chaque chromosome sous forme de paires de chromosomes homologues à deux chromatides (Diploïde, $2n$, $4c$), de créer quatre cellules filles avec dans chacune, chaque chromosome sous forme d'un chromosome à une chromatide (Haploïde, n , c) (Figure 3). Ces deux divisions sont nommées méiose 1 et méiose 2. La méiose 1 est spécifique à la méiose et est une division dite réductionnelle donnant deux cellules haploïdes avec des chromosomes à deux chromatides chacun. La méiose 2 est une division dite équationnelle donnant quatre cellules haploïdes avec des chromosomes à une chromatide chacun. Une série d'innovations supplémentaires par rapport à la mitose est à l'origine de ces deux séparations chromosomiques. Chacune des deux divisions est composée des quatre phases, les mêmes que la mitose. La méiose 2 ressemble dans son fonctionnement à une mitose classique d'une cellule. En revanche la méiose 1 est plus complexe. En premier lieu nous pouvons citer la formation de bivalents qui consiste en la liaison physique entre deux chromosomes homologues chacun constitué de deux chromatides sœurs répliquées. Si les trois dernières phases consistent en la séparation des chromosomes homologues, la première phase, la prophase 1, est le siège de l'appariement de ces chromosomes homologues. Cette prophase particulière est elle-même divisée en 5 étapes : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diacinèse (Figure 3). Au préalable, chaque chromatide entre en cohésion avec sa sœur en vue de se condenser durant le leptotène sous forme de structures distinctes apparentées à des fils. Durant ce même stade, les chromosomes homologues commencent à s'apparier en

préparation du zygotène, au cours duquel se forme la synapse. Ce processus voit la mise en place d'un complexe protéique le long des chromosomes homologues afin de les relier à l'image d'une fermeture éclair, le complexe synaptonémal. Au stade pachytène, la synapse est complète, c'est-à-dire que les deux homologues sont joints étroitement sur toute leur longueur, le complexe synaptonémal se désagrège alors et la chromatine se décondense. Ce n'est que lors du diplotène que les chromosomes se recondensent et que des liens physiques appelés aussi chiasmas, se créent, pour assurer l'égal répartition des chromosomes à la fin de la méiose 1. Chez la plupart des espèces, cette liaison particulière dépend d'au moins un échange réciproque entre deux chromatides homologues par bivalent appelé crossover (CO). Afin que les chromosomes homologues ségrégent correctement et que des gamètes viables se forment, la formation d'au moins un CO par bivalent est indispensable chez la plupart des espèces. C'est alors l'entrée dans la première phase de division méiotique aussi appelée diacinèse. Une série de contrôles spécifiques à la méiose est mise en place pour assurer la bonne séparation des chromatides sœurs ainsi que la bonne orientation du kinétochore pour assurer une ségrégation équilibrée des chromosomes à chaque étape de la méiose (méiose 1 et 2). Enfin, alors que la mitose impose une alternance stricte entre division et réplication, ici les règles changent afin que les deux divisions méiotiques se suivent strictement.

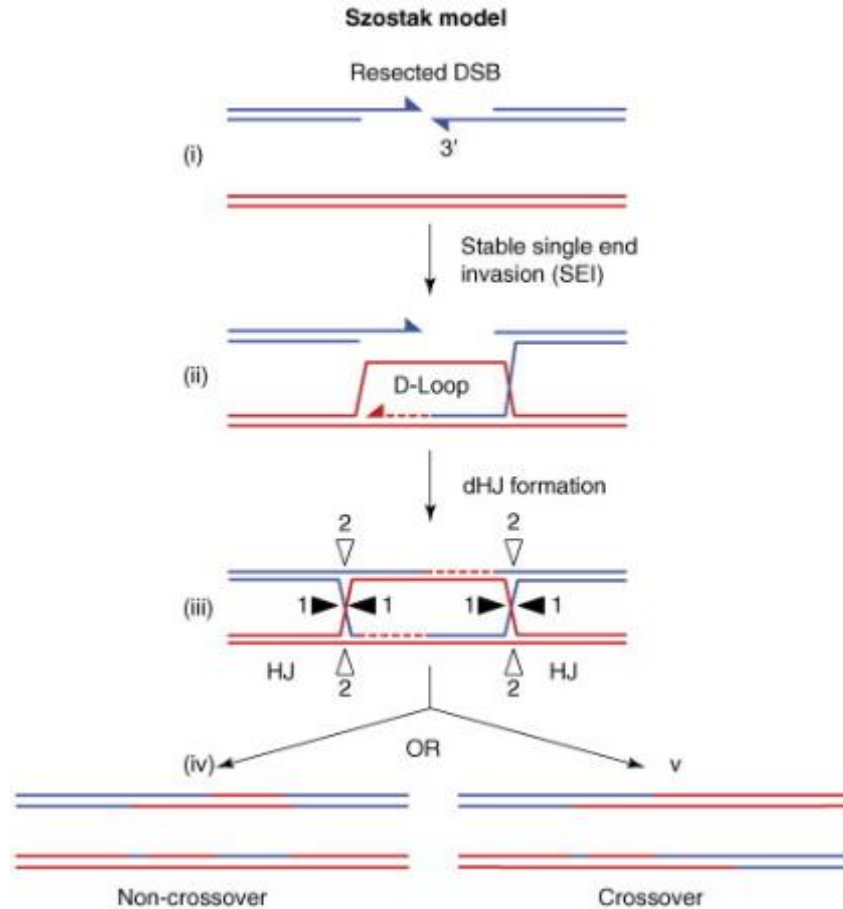


Figure 4 : Modèle de la formation de CO et de NCO par Szostak. Dans le modèle de Szostak, une cassure double-brins (CDB) apparaît sur un chromosome homologue (bleu) et les deux extrémités en duplex de cette CDB sont traitées pour former des extrémités 3' simple brin (i). Une extrémité de la CDB envahit l'autre chromosome homologue (rouge) et met en place une structure dite D-loop (ii). La synthèse d'ADN permet le prolongement de la D-loop et permet l'hybridation du second côté de la CDB. Une synthèse supplémentaire d'ADN comble les lacunes restantes et une double structure dite double jonction de Holliday (dHJ) se forme (iii). Le clivage et l'hybridation (ou « résolution ») de l'une ou l'autre paire de brins orientés de la même façon dans chaque dHJ ("1" ou "2") se produisent de manière aléatoire. Dans la figure, la dHJ de gauche a été résolu avec l'orientation «1»; La résolution de la dHJ de droite dans l'orientation «1» produit alors un non-crossover (NCO) (iv) et dans l'orientation «2» un crossover (CO) (v). (Cromie and Smith, 2007)

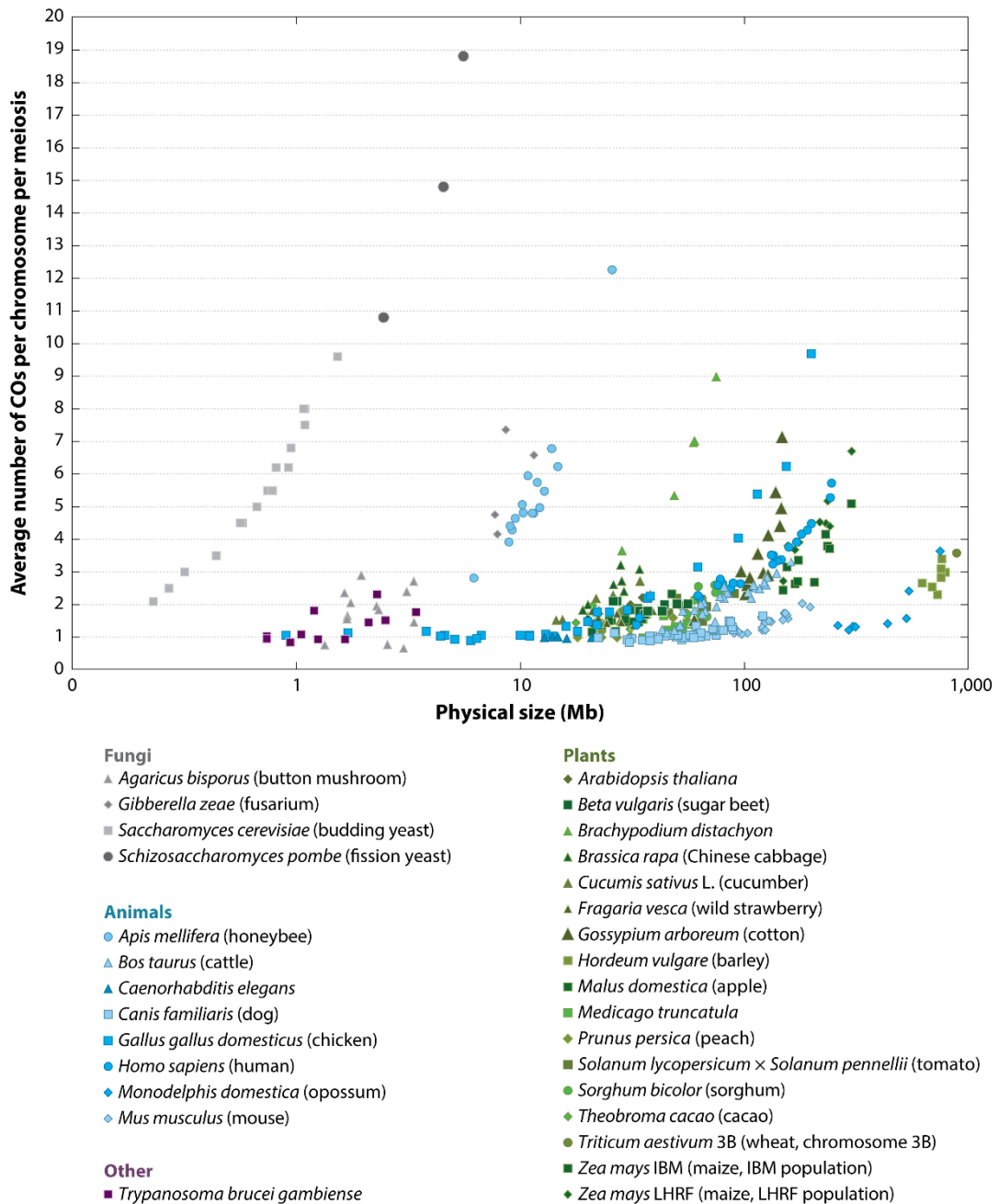
2.2 La recombinaison méiotique

2.2.1 Généralités

Un premier mécanisme de fonctionnement a été proposé par Jack W. Szostak en 1983 (Figure 4) (17, 18). La recombinaison méiotique est initiée par la formation de cassures double-brins (CDB) d'ADN. Ces cassures sont catalysées par la protéine SPO11, initiateur de la recombinaison méiotique (19). S'en suit une résection des extrémités 5' des doubles brins d'ADN et l'invasion, par le brin réséqué, de la matrice de réparation qui peut être soit la chromatide sœur soit une des deux chromatides homologues. Reste enfin l'étape de réparation à proprement dite où le brin réséqué envahit puis copie la matrice de réparation pour former une structure appelée double jonction de Holliday (dHj) (7, 8). Cette structure est ensuite résolue de différentes façons et peut donner lieu soit à des crossovers (CO, échanges symétriques de grands fragments d'ADN entre deux chromatides homologues) soit à des non-crossovers (NCO ; modification asymétrique d'une seule des chromatides homologues par copie d'une petite portion du chromosome homologue intact utilisé comme matrice de réparation). Chez quasiment toutes les espèces, la distribution des événements de recombinaison n'est pas homogène le long des chromosomes quelle que soit l'échelle étudiée. A une échelle plus fine, les CO et les NCO sont regroupés en régions de quelques kilobases dont la position correspond le plus souvent à la position des CDB. Il existe cependant une grande différence entre le nombre de CO et de NCO, en effet les NCO représentent en moyenne 95% des événements de réparation des CDB (21).

2.2.1.1 *Les Crossovers ou CO*

Deux types de zones peuvent être identifiés le long d'un chromosome en fonction de la répartition des CO : les zones chaudes (ou recombinogènes) avec un taux de CO au-dessus de la moyenne et



AR Mercier R, et al. 2015.
 Annu. Rev. Plant Biol. 66:297–327

Figure 5 : Nombre de crossovers (CO) par chromosome par méiose chez un grand nombre d'eucaryotes. Le nombre de CO, déduit des cartes génétiques moyennes mâle/femelle, est tracé en fonction de la taille physique de chaque chromosome autosomique (Mo, échelle logarithmique). (Mercier *et al.*, 2015)

des zones froides (ou non-recombinogènes) avec un taux de CO en-dessous de la moyenne. On peut également identifier les points chauds (petites régions avec un très fort taux de recombinaison) et les points froids qui eux ne présentent aucune recombinaison. Il y a rarement plus de trois CO par bivalent, quelle que soit la taille physique du chromosome. La figure 5 (21) montre que 76% des chromosomes présentent au maximum trois CO, et 84% quatre. Par exemple, le chromosome 3B du blé tendre, considéré comme géant à l'échelle des espèces avec une taille physique d'environ 1 Gb, présente une moyenne de 3 CO par méiose, ce qui est comparable au nombre du plus long chromosome d'*Arabidopsis* (31 Mb) et du plus petit chromosome de levure (0,3 Mb). Cette apparente limite n'est pas due à un nombre réduit de CDB, car chez les espèces végétales, le nombre estimé de CDB dépasse largement le nombre de CO (environ 10 à 50 fois). Cette limite est plutôt due à plusieurs mécanismes actifs empêchant certaines CDB de devenir des CO. En outre, l'interférence (le phénomène qui fait que deux CO successifs seront plus éloignés sur un chromosome que ce à quoi on pourrait s'attendre) pourrait également contribuer à limiter le nombre de CO (22, 23). L'interférence va permettre aussi de distinguer deux classes de CO, ceux de classe I et ceux de classe II. Les CO de classe I vont être sensibles à l'interférence alors que ceux de classe II ne le seront pas. Cependant ce n'est pas la seule façon de distinguer ces deux classes de CO, deux voies bien distinctes avec des partenaires moléculaires propres à chacune vont être à l'origine de ces deux classes de CO. La faible variation du nombre de CO par chromosome soulève la question de savoir quelles forces évolutives limitent ce nombre. Louis & Borts (24) ont émis l'hypothèse qu'un grand nombre de CO par chromosome pourrait créer des contraintes topologiques empêchant une ségrégation adéquate. Néanmoins certaines exceptions comme *S. pombe* et les abeilles domestiques mettent à mal cette affirmation. En effet chez ces espèces il y a un nombre et une densité de CO élevés et pourtant elles présentent une ségrégation chromosomique fidèle. De même, des données récentes obtenues chez *Arabidopsis* ont montré que la méiose peut se dérouler

normalement même lorsque le nombre de CO augmente artificiellement de trois fois (25) ou de neuf fois (R. Mercier, données non publiées). L'hypothèse mécanique étant donc peu probable, ces résultats suggèrent qu'il existe un niveau optimal de recombinaison proche d'un CO par chromosome nécessaire pour l'adaptation des espèces.

2.2.1.2 *Les Non-Crossovers ou NCO*

Les CO ne représentant qu'une très faible proportion des événements de réparation des CDB (environ 5%), il existe donc en plus des deux voies de formation des CO précédentes d'autres mécanismes responsables de la réparation des CDB. Une grande question encore sans vraie réponse mais au cœur de toute étude de la méiose est le devenir des CDB non réparées en CO. Un devenir évident est la réparation en NCO comme c'est très largement le cas chez la levure par exemple. Les NCO sont malheureusement très mal documentés chez les plantes, en partie dû au fait qu'ils sont extrêmement difficiles à détecter. De récentes études ont porté sur la détection, le taux et la caractérisation au niveau moléculaire des NCO chez *Arabidopsis*, soit grâce au séquençage du génome, de quelques événements méiotiques ou même en caractérisant quelques NCO sur quelques locus par pollen typing ou visuellement grâce à des lignés marquées par fluorescence. Ces études ont clairement confirmé l'existence de NCO dans les plantes, mais ils ont été détectés à une fréquence étonnamment faible par méiose. Sur trois études indépendantes à l'échelle du génome (26–28), seulement 19 événements NCO ont été détectés dans 11 méioses indépendantes, soit une moyenne de 1,7 NCO détectés par méiose. Les 12 événements de recombinaison détectés en moyenne par méiose chez *Arabidopsis* (10 CO et 2 NCO) sont encore loin des 250 CDB estimés. Cette grande différence peut s'expliquer de deux manières, non-exhaustives par ailleurs. Une première explication serait qu'une grande proportion des CDB pourrait être réparée en utilisant la chromatide sœur comme matrice, comme observé chez la levure, les rendant ainsi indétectables.

Chez des plantes d'*Arabidopsis* haploïdes, des études ont montré que les CDB peuvent effectivement être réparées avec la chromatide sœur comme modèle, sans pour autant apporter de précisions sur la fréquence à laquelle ce type de réparation a lieu chez les plantes sauvages diploïdes (29). Une deuxième explication serait que la majorité des NCO serait en fait des évènements très courts (quelques pb) et l'absence d'un niveau suffisant de polymorphisme pourrait faire que la plupart d'entre eux n'est pas détectable. La formation des NCO peut découler de plusieurs mécanismes (21) dont le plus important est celui du SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) durant lequel la D-loop est démantelée avant la formation de la dHj, comblant ainsi de manière simple brin la CDB. S'en suit alors une synthèse prenant pour matrice l'ADN simple brin généré lors de l'invasion et de la formation de la D-loop. Un deuxième mécanisme implique la dissolution de la dHj une fois celle-ci formée et la synthèse ADN terminée. La dHj peut être aussi résolue en NCO et non en CO de classe II. Il existe aussi le mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues (ou Non-Homologous End Joining, NHEJ) qui va permettre aux deux extrémités réséquées d'être ressoudées par l'intervention de ligases (30). Il existe certainement d'autres mécanismes amenant à la formation de NCO, mais à ce jour ils ne sont pas connus.

2.2.2 Facteurs impactant la recombinaison

Les mécanismes qui régissent la localisation des CDB ont fait l'objet de récentes découvertes chez la souris, l'homme et la levure, mettant en lumière à la fois des stratégies moléculaires conservées entre les espèces et des stratégies spécifiques à chaque espèce. De nombreux facteurs ont été identifiés comme influençant la recombinaison méiotique : le ciblage de la machinerie de la recombinaison lié à la séquence ADN, les marques épigénétiques, l'interférence et les facteurs environnementaux.

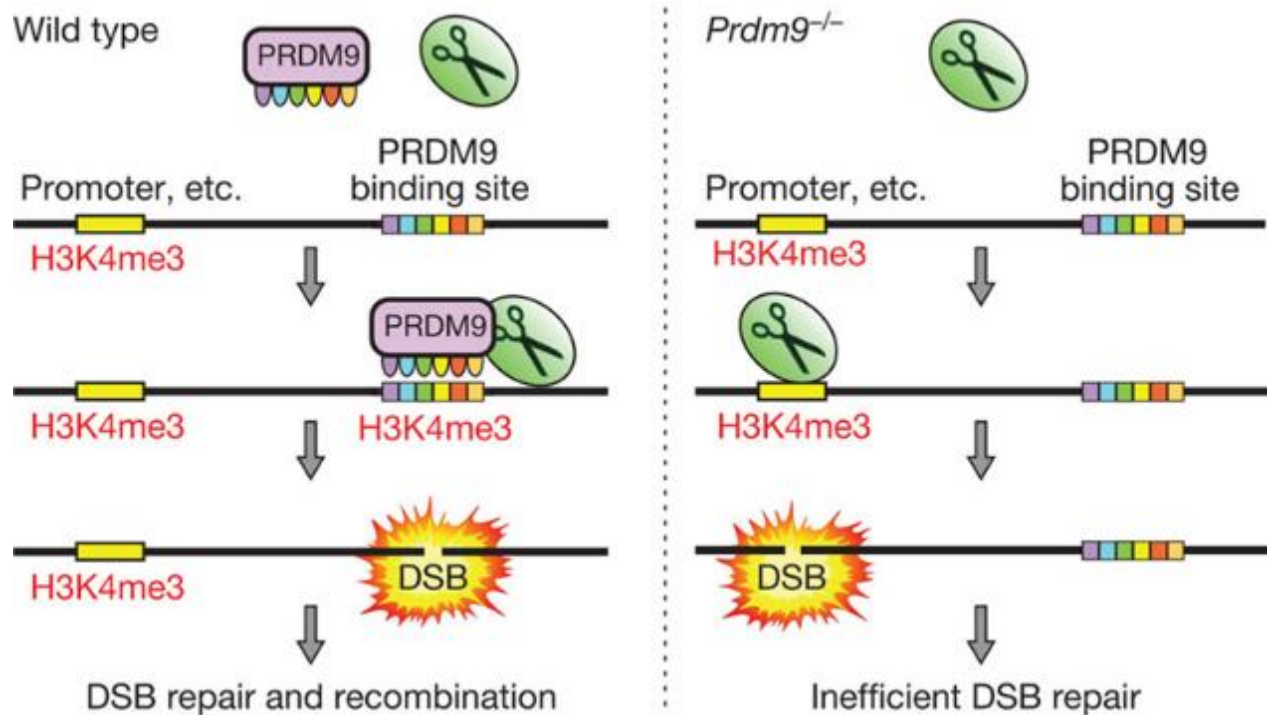


Figure 6 : Rôle proposé de la protéine PRDM9. A gauche: dans les cellules contenant une copie fonctionnelle de PRDM9 (type sauvage), la machinerie (ciseaux) de formation de la cassure double-brin (CDB) est dirigée vers les sites de CDB préférentiels ou sites de liaison de PRDM9. A droite: en l'absence de PRDM9, la machinerie de formation de DSB fait des ruptures opportunistes aux marques H3K4me3 indépendantes de PRDM9 telles que celles des promoteurs. Il en résulte une réparation inefficace de la CDB et un arrêt de la méiose. (Brick *et al.*, 2012)

2.2.2.1 Une protéine : PRDM9

La souris et l'Homme utilisent les mêmes stratégies moléculaires en ce qui concerne la régulation de la recombinaison. Initialement chez l'homme, il a été montré que le motif CCTCCCT est surreprésenté au niveau des points chauds situés dans le rétrotransposon *THE1A/B* qui est spécifique aux primates (31–34). De plus, Myers *et al.* en 2008 (33) ont suggéré que tout motif générique favorisant l'apparition de points chauds devrait fonctionner dans différents fonds génétiques chez l'Homme. Ils ont aussi révélé la présence d'un motif commun dégénéré de 13 pb (CCNCCNTNNCCNC) reconnu par une protéine particulière, PRDM9 (35), par le biais d'une structure en doigts de zinc (Figure 6). Chez la souris et l'homme, la protéine PRDM9 possède un domaine SET qui favorise le dépôt de marque H3K4me3 (36). Les sites de CDB affichent un enrichissement dans cette marque mais la façon dont celle-ci est reconnue pour la formation des CDB reste encore peu connue. Chez la levure le complexe SET1 va déposer le même type de marque au niveau des futurs sites de CDB et la protéine SPP1 (faisant partie du complexe précédent) fait le lien entre cette marque et le complexe responsable de la formation des CDB. En dépit de ces points communs, chez la levure les CDB ont lieu le plus souvent dans les promoteurs de gènes transcrits alors que chez la souris, PRDM9 aurait plutôt tendance à éloigner les sites de cassures des sites initiateurs de la transcription (37).

Chez les plantes, aucun orthologue de la sous-famille PRDM9 n'a été trouvé (38). Cependant, la plupart des gènes codant pour des méthylases responsables de la marque H3K4me3 sont exprimés dans les cellules méiotiques d'*Arabidopsis* et de riz (38) et cette marque est associée à des régions recombinogènes chez *Arabidopsis* et l'orge (39–41). Il pourrait même s'agir d'un mécanisme général de régulation chez les eucaryotes provenant de l'ancêtre des eucaryotes (21, 38). Chez les plantes, plusieurs études ont révélé des motifs répétés fortement associés à des points chauds de recombinaison méiotiques. Des associations significatives ont été trouvées entre les points chauds

et les tronçons poly-A (27, 39, 40), qui se localisent préférentiellement en amont des sites de SST, ce qui entraîne une occupation réduite des nucléosomes facilitant l'accessibilité des sites pour le mécanisme de recombinaison (42–45). De manière similaire, les motifs de séquences répétées CCN et CTT ont également été détectés comme étant associés à des points chauds de recombinaison (27, 39, 40). Ces motifs sont également situés à proximité des TSS et sont similaires au motif ciblé par la protéine PRDM9 chez l'homme et la souris, ce qui peut suggérer une reconnaissance similaire par la machinerie de recombinaison. Les motifs Poly-A, CCN et CTT dégénérés peuvent ainsi contribuer à la structuration de la chromatine dans les régions promotrices des plantes, avec des conséquences sur la recombinaison méiotique. Cependant, aucun motif spécifique tel que celui ciblé par PRDM9 (CCNCCNTNNCCNC) chez l'homme et la souris n'a été trouvé jusqu'à présent chez les plantes pour expliquer la présence de points chauds de recombinaison. De même, de récents travaux ont permis de mettre en lumière le lien entre la chromatine, les caractéristiques de l'ADN et la localisation de CDB. Par exemple, chez le maïs, la méthylation de l'ADN, les sites d'insertion de transposons *Mu* et la richesse de certaines régions en CO sont corrélés (46).

L'analyse à petite échelle du schéma de recombinaison chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) a longtemps été entravée par la taille, la complexité et la polyploïdie de son génome (17 Gb; 80-85% de séquences répétées; $2n = 6x = 42$). Les premières études étaient basées sur des stocks aneuploïdes (lignées de délétion) (47) et ont révélé que la fréquence de la recombinaison méiotique est fortement biaisée vers les extrémités des chromosomes (48–50). Toutefois, cela ne dépend pas de la position distale car, lorsque les bras chromosomiques sont inversés (télomères placés aux centromères et vice-versa), les CO se trouvent toujours dans la même région, quel que soit son emplacement (51). Un seul point chaud a été signalé dans le promoteur du gène *TaHGA3* sur le chromosome 3B (52) et ce point chaud était associé à un NCO couvrant 453-1098 pb. Récemment, la séquence de référence du chromosome 3B et les projets d'assemblages des 20 autres

chromosomes ont été publiés (53, 54), offrant la possibilité de caractériser avec précision les points chauds de recombinaison à l'échelle du génome entier.

2.2.2.2 La Séquence ADN

De nombreuses études ont démontré que les CDB (et par extension les CO) n'était pas distribués au hasard le long de la séquence et ainsi la formation des CDB peut aussi être favorisée par l'enrichissement des points chauds en adénine et en motif CTT contribuant à l'organisation de la chromatine. Par exemple, les points chauds étudiés chez *Arabidopsis* par typage de grain de pollen (pollen typing) se sont retrouvés localisés dans des régions promotrices et terminatrices des gènes. Parallèlement, sept des huit points chauds décrits chez le maïs sont proches de gènes. Chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) les CO sont majoritairement localisés proches des gènes (50, 55) et au moins un point chaud a été localisé dans un gène (50). Ainsi, et comme pour la levure (mais contrairement à la souris), la recombinaison méiotique chez les plantes co-localiserait avec des régions régulatrices de gènes. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, des analyses dites coalescentes ont permis de révéler la localisation préférentielle des points chauds dans les promoteurs et les terminateurs de gènes (39). Ces régions présentent en générale des caractéristiques particulières favorisant la transcription (RNAPol II) comme la faible densité en nucléosomes et les marques H3K4me3 et H2A.Z. Souvent chez les plantes, à l'échelle du génome, des régions avec des taux de recombinaison élevés cohabitent avec des régions dont le taux est nettement inférieur à la moyenne du génome. Chez la levure, *Arabidopsis*, l'homme et le blé, plus de 80% des évènements de recombinaison ont lieu dans moins d'un quart du génome. Ceci est dû en partie au fait que dans de nombreuses espèces végétales les régions centromériques sont dépourvues de CO (56). Ce n'est pas toujours le cas, par exemple, chez *Allium fistulosum* les crossing-overs semblent se situer près du centromère voire à l'intérieur (57). De plus chez les

espèces à grand génome, cette distribution est biaisée aux parties distales des chromosomes (les chiasmas étant distaux) mais d'autres espèces comme le riz, la tomate ou encore *Arabidopsis* présentent un taux de recombinaison variable le long du chromosome.

Chez la Mimule tachetée (*Mimulus guttatus*) et *Arabidopsis thaliana*, la fréquence de CO augmente en approchant des sites d'initiation de la transcription (TSS) (et dans une moindre mesure en approchant des sites de terminaison de la transcription (TTS) chez *Arabidopsis* (39)) et diminue fortement une fois ces sites dépassés, mettant en lumière une polarité évidente. Chez le sorgho, une corrélation similaire a été observée avec 97 à 98% des CO dans les régions d'euchromatine (58). En étudiant la recombinaison du maïs (59–61) et du blé (52), des chercheurs ont découvert la présence de petites régions présentant des taux de recombinaison élevés. Ces intervalles, allant de 380 à 11 600 pb, présentent un taux de recombinaison variant de 22 à 132 cM/Mb, alors qu'en moyenne sur les chromosomes, les taux sont de 2,1 cM/Mb pour le maïs et 0,20 pour le blé. Comme pour *Arabidopsis* et la Mimule, les CO sont plus fréquents dans les régions 5' des gènes, ce qui confirme qu'à l'instar de la levure (45), de l'Homme et de la souris (36, 37), chez les plantes, les points chauds sont plutôt localisés dans les promoteurs. Cependant, de nombreuses régions riches en gènes montrent peu ou pas de recombinaison chez les plantes (62), alors que des régions enrichies en répétitions recombinent (63). Ceci interroge sur un potentiel rôle des séquences répétées dans la distribution de recombinaison. L'abondance, la diversité et l'activité des transposons varient grandement d'une espèce à l'autre et ceux-ci ont développé diverses stratégies pour se multiplier chez l'hôte, par exemple par insertion préférentielle à proximité des gènes (64, 65). Les éléments transposables (Transposable Element, TE) contribuent à la forme et à la fonction des chromosomes (66), mais des résultats contradictoires sont observés en ce qui concerne l'impact du contenu en TE sur la recombinaison. Les séquences répétées et le taux de recombinaison sont positivement corrélés chez *Caenorhabditis elegans* (63) et négativement dans le génome de

Drosophila melanogaster (67). Chez le blé tendre il existe une différence dans la composition en TE entre les intervalles recombinogènes ou non recombinogènes (55). Ainsi, les motifs ADN correspondant à certains TE sont associés à de hauts taux de recombinaison, ce qui laisse à penser qu'il existe un mécanisme ancestral de recombinaison chez les eucaryotes.

2.2.2.3 Les marques épigénétiques

Chez le riz, la tomate ou encore *Arabidopsis*, les CDB sont localisées dans des régions chromosomiques dans lesquelles sont fortement concentrées des histones H3 triméthylées au niveau de la lysine 4 (H3K4me3). Chez le blé tendre, une étude montre que la recombinaison a lieu plus fréquemment dans des régions associées aux gènes (promoteurs et terminateurs) et que celles-ci sont enrichies en transposons (55). Ces transposons ont été identifiés comme faisant majoritairement partie de la famille des Mariner et le motif TIR caractéristique de cette famille se voit fortement associé aux événements de recombinaison. Ce motif est similaire au motif reconnu par la protéine PRDM9, responsable des CDB chez les mammifères, ce qui suggère que ces deux mécanismes seraient apparentés.

Chez le maïs, les sites d'insertion du transposon *Mu* se concentrent dans les mêmes régions où a lieu la recombinaison méiotique (68), alors que des études à petite échelle au locus *bronze* ont révélé une réduction de la recombinaison dans les régions qui contiennent des TE suggérant une influence négative des rétrotransposons sur la recombinaison en raison de la méthylation associée à une condensation de la chromatine (69–71). Chez *Arabidopsis*, la méthylation de l'ADN peut neutraliser les points chauds de recombinaison et joue un rôle essentiel dans la formation des domaines de recombinaison méiotique le long des chromosomes (72). Une étude chez la souris a récemment révélé que la méthylation de l'ADN peut empêcher les transposons d'adopter les caractéristiques de la chromatine susceptibles de faciliter la recombinaison méiotique (73)

soulignant l'importance de la conformation de l'ADN et du rôle probable des marques épigénétiques sur la recombinaison.

2.2.2.4 *L'interférence*

L'interférence est définie comme l'impossibilité d'observer un CO au voisinage d'un autre CO sur la même paire de chromosomes (74). En effet, lorsque l'on regarde la répartition des CO le long du génome et que l'on connaît la classe à laquelle ils appartiennent, on remarque que les CO de classe I sont distribués systématiquement suffisamment loin les uns des autres le long du chromosome pour que cela soit dû simplement au hasard et que les CO de classe II sont distribués indépendamment les uns des autres (22). Seuls les CO de classe I sont soumis à l'interférence. Chez un mutant de la voie de formation des CO de classe I, les CO restant sont donc ceux de classe II non soumis à l'interférence (21, 75–77). De façon intéressante, chez un mutant de la voie de formation des CO de classe II, l'interférence est augmentée (78). De plus, les CO soumis à l'interférence et ceux ne l'étant pas cohabitent naturellement dans les plantes (79–82). Chez la tomate, en associant la détection de tous les CO par microscopie électronique avec la localisation des CO de classe I par microscopie optique (foci MLH1), il a été possible d'observer la distribution le long du chromosome des deux classes de CO dans les plantes en fond sauvage (83). Ces résultats montrent que la proportion de CO non soumis à l'interférence est plus élevée en région péricentromérique que dans le reste du génome. Une hypothèse pouvant expliquer cette répartition serait que les CO de classe I sont répartis régulièrement en commençant par les régions distales pour les grands chromosomes (certains de ces CO pouvant aussi être localisés au milieu du bras). En cas de défaillance de la voie responsable de la formation des CO de classe I, la voie des CO de classe II interviendrait alors pour terminer en urgence la résolution de dHj dites tardives probablement plus fréquentes en région péricentromérique.

2.2.2.5 Les facteurs environnementaux

D'autres phénomènes viennent aussi altérer la distribution des CO comme l'augmentation de la température ou encore l'utilisation d'engrais. Chez l'orge, un léger changement de température (+5-8°C) est suffisant pour modifier la progression méiotique (84) et la répartition des CO, délocalisée au niveau des régions proximales (85). En 2017, Draeger and Moore (86) ont démontré que l'exposition à de courtes période de haute température durant la méiose empêchait une progression normale de la méiose et réduisait le nombre de grain chez le blé tendre. Les plantes ont été exposée à des températures allant de 30 à 35°C pendant des périodes de 20h durant les étapes méiotiques et pré-méiotiques. Ainsi une période de sensibilité à la chaleur a été identifiée allant de l'interphase au leptotène. Plus récemment, il a été montré qu'une température élevée induit une hyper-recombinaison méiotique chez *Arabidopsis thaliana* et que les CO supplémentaires sont de classe I mais ne sont pas dus à une augmentation du nombre de CDB (87). Des études moins récentes (88) montrent qu'une multitude de stress environnementaux comme la sécheresse, le froid ou encore l'exposition à des substances chimiques altèrent le développement de l'appareil reproducteur mâle et ainsi ont un impact sur la méiose. Par exemple, le magnésium présent dans la solution de Hoagland est responsable de l'augmentation de la fréquence de la recombinaison méiotique chez des hybrides de blés sauvages (*Aegilops variabilis*) mutants pour le gène *ZIP4-B2* (89).

En prenant en compte les différents mécanismes de résolutions des CDB et les différents facteurs impactant la recombinaison méiotique à proprement parler, on se rend compte que celle-ci représente un processus très complexe dont la mise en place et la régulation font intervenir un très grand nombre d'acteurs.

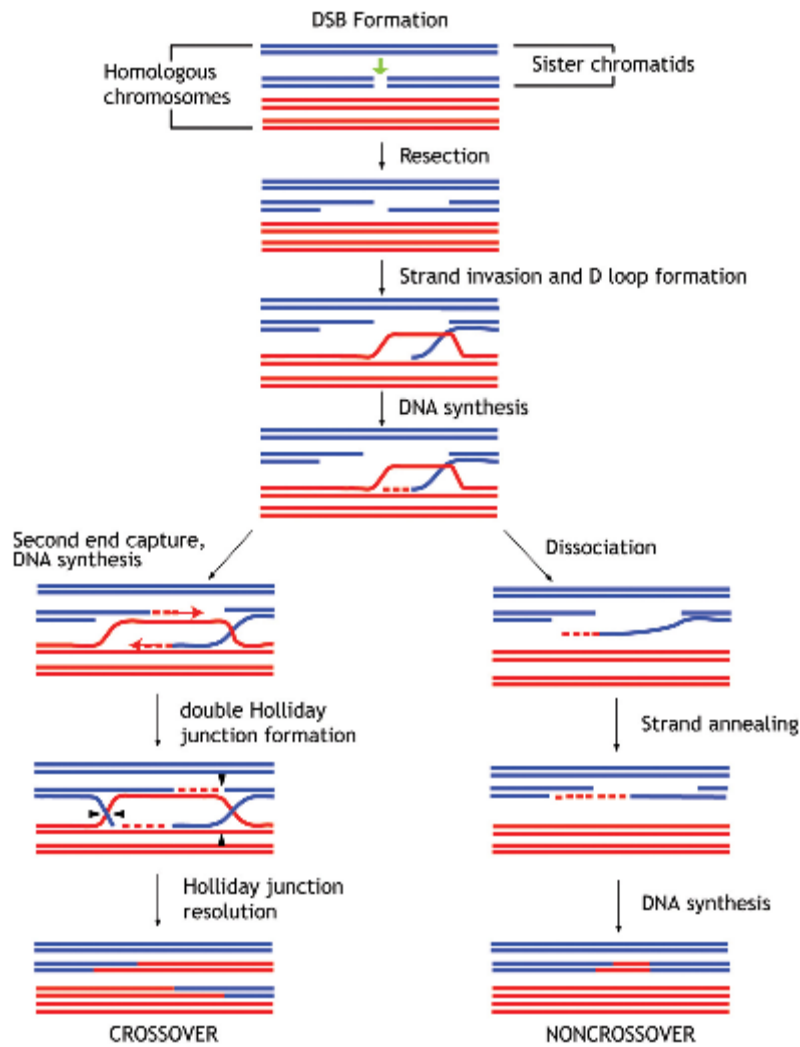


Figure 7 : Modèle illustrant les événements clés de la recombinaison méiotique. Les chromosomes homologues sont représentés en rouge et en bleu, et les deux chromatides sœurs de chaque homologue sont représentées par des paires de molécules d'ADN double brin indiquées par deux lignes parallèles très proches les unes des autres. Les événements moléculaires de recombinaison sont représentés en progression temporelle à partir du haut du diagramme avec la formation d'une cassure double-brin (CDB) dans une seule chromatide de l'un des homologues. La résection des extrémités 3' de la CDB favorisent l'invasion d'une des deux chromatides de l'autre chromosome homologue, la formation d'une D-loop et le début de la synthèse de l'ADN. Ces intermédiaires peuvent être déstabilisés et conduire à la réparation de la CDB en NCO. Ils peuvent être aussi stabilisés par des facteurs favorisant la formation de doubles jonctions de Holliday et ainsi la formation de CO. Le clivage asymétrique des doubles jonctions de Holliday par différentes endonucléases favorise la formation d'événements de CO inter-homologues. (Hillers *et al.*, 2017)

2.3 Les acteurs de la recombinaison

La recombinaison méiotique fait appel à une voie spécialisée dans la formation et la réparation de cassures double-brins (CDB) d'ADN. La réalisation de toutes ces étapes est régie par des partenaires protéiques de mieux en mieux identifiés au fil des années. Le modèle actuel de la recombinaison méiotique, et les gènes impliqués, agit essentiellement au niveau de la formation et la réparation des CDB. Plusieurs voies mènent alors à la formation des CO et des NCO (Figure 7) (90).

2.3.1 Formation des cassures double-brins

Les cassures double-brins de l'ADN sont catalysées lors de la méiose par la très conservée protéine SPO11 (Figure 8). Sa fonction catalytique a été découverte grâce à la similitude de séquence qu'elle possède avec la sous-unité A d'une nouvelle classe de topoisomérase (topoisomérase VI) identifiée dans les archées. Ces enzymes jouent sur la caténation de l'ADN en induisant des CDB tout en forçant le passage d'un autre brin d'ADN à travers cette cassure et assurant enfin la réparation de la rupture (ligation). La topoisomérase VI forme un hétérotétramère A₂B₂, néanmoins aucune sous-unité B ne semble impliquée dans la recombinaison méiotique. Face à la forte similitude avec la sous-unité A, SPO11 formerait donc un dimère pour la catalyse des CDB lors de la méiose. Chez la plupart des espèces, SPO11 est codée par un seul gène *Spo11* mais chez les plantes il existe plusieurs homologues de *Spo11*. Chez *Arabidopsis thaliana*, trois homologues ont été identifiés, AtSpo11-1, AtSpo11-2 et AtSpo11-3. Des études ont montré que les protéines AtSPO11-1 et AtSPO11-2 sont toutes les deux nécessaires pour la réalisation des CDB, potentiellement sous forme d'hétérodimère. AtSPO11-3 quant à elle, a été identifiée comme ayant un rôle dans l'endoréduplication somatique, ne jouant aucun rôle dans la méiose (91–93) (M. Grelon, données

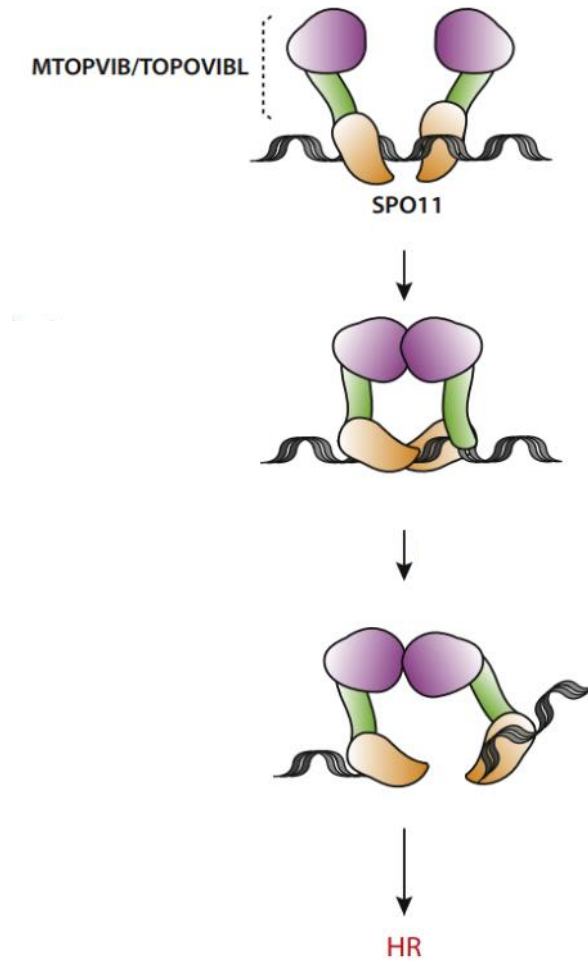


Figure 8 : Modèle proposé par Robert *et al.* (2016) pour la formation des cassures double-brins lors de la méiose. La formation de DSB méiotique est catalysée par un dimère SPO11 dont la formation est susceptible d'être médiée par les protéines de type TopoVIB méiotiques. La formation d'un complexe stable de type TopoVI impliquant deux sous-unités SPO11 et deux sous-unités méiotiques de type TopoVIB est nécessaire pour cliver l'ADN et déclencher une recombinaison homologue (HR).

non publiées). Chez le riz, 5 homologues de la protéine SPO11 ont été décrits (94, 95) mais seuls OsSPO11-1 et OsSPO11-2 (96) sont impliqués dans la formation des CDB. Des études génétiques classiques ont permis de découvrir cinq nouveaux gènes nécessaires à la formation des CDB méiotiques chez les plantes (Prd1, Prd2, AtPrd3 / OsPair1, AtDfo, Mpo et Crc1) (97–101) (Figure 8). AtPrd3/OsPair1 (98, 100) et AtDfo (101) sont spécifiques à la plante. PRD1 montre des similitudes avec MEI1, une protéine de souris également requise pour l'initiation des CDB (97). PRD2 montre de légères similitudes structurelles avec des protéines de levure responsables de CDB, ScMei4 et SpRec24 (102). A l'instar de PRD2, les gènes *PHS1* de *Zea mays* et d'*Arabidopsis thaliana* (102) montrent le même type de similitudes structurelles. Néanmoins, le mutant *phs1* ne présente aucun phénotype CDB-déficient, que ce soit chez le maïs ou chez *Arabidopsis* (103). Enfin, la protéine CRC1 de riz, l'homologue de la protéine de levure PCH2, est impliquée dans la formation des CDB (99) et interagit notamment avec OsPAIR1/PRD3 *in vitro*. Curieusement, PCH2 n'est pas nécessaire pour la formation des CDB chez la levure ou chez *Arabidopsis* (104) mais est nécessaire plus tard dans le déroulement de la recombinaison méiotique.

2.3.2 Traitement des cassures double-brins et choix de modèle homologue

Dans une cellule diploïde à la suite d'une réplication, trois structures ADN intactes sont disponibles pour la réparation des CDB : la chromatide sœur, et les deux chromatides du chromosome homologue. La chromatide sœur peut en effet être utilisée pour la réparation des CDB (29) mais la proportion dans laquelle elle est utilisée reste indéterminée. Le chromosome homologue est bien sûr utilisé comme matrice de réparation, la formation d'au moins un CO par paire de chromosomes homologues étant obligatoire en méiose. Au moins un complexe de réparation des CDB est alors dirigé vers le chromosome homologue, un phénomène très réprimé durant la recombinaison

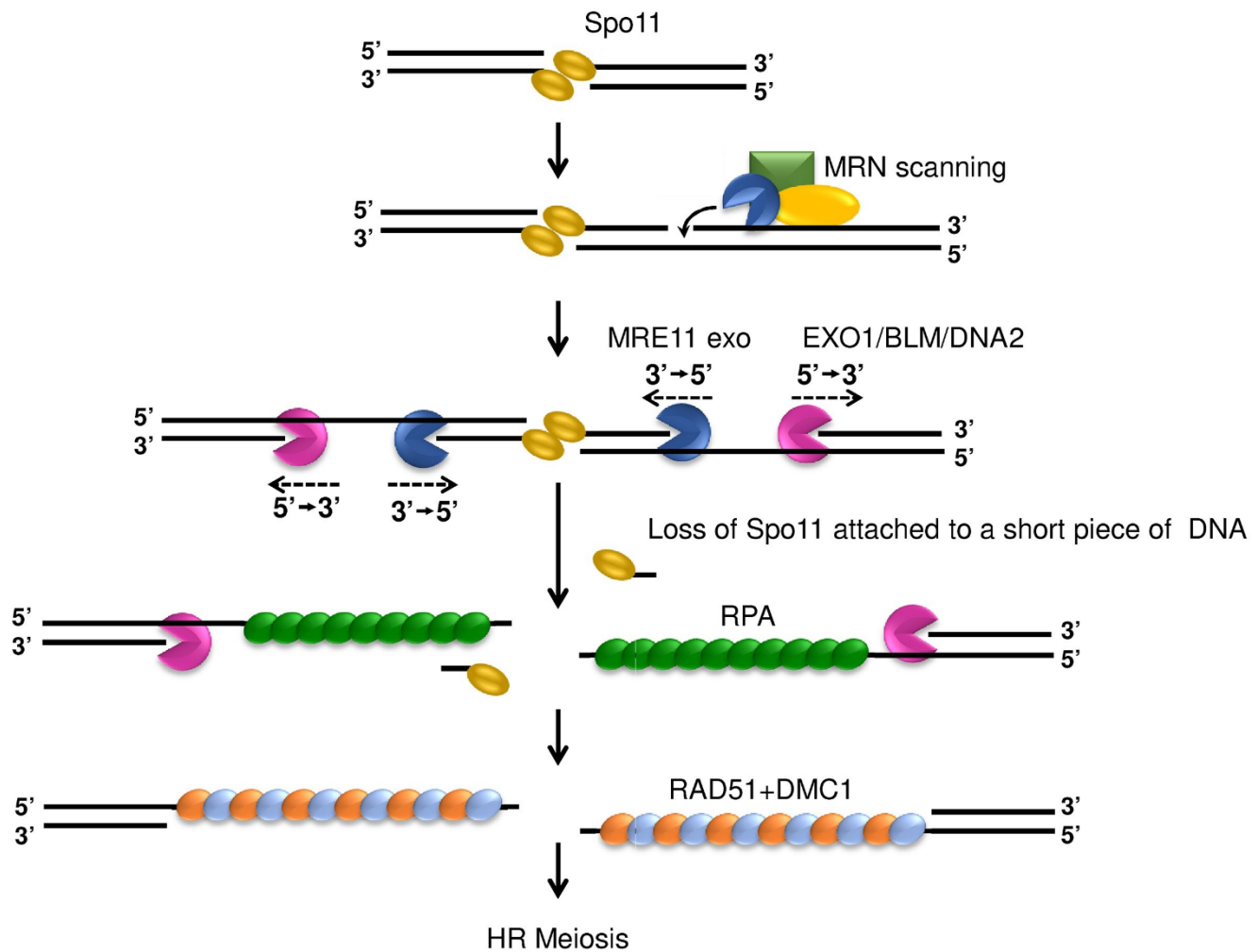


Figure 9 : La résection lors de la méiose. Spo11 crée des cassures double-brins, initiatrices de la recombinaison homologue lors de la méiose. La résection est initiée par l'activité de l'endonucléase MRE11. La résection bidirectionnelle s'ensuit par les exonucléases MRE11 et EXO1/BLM/DNA2. Spo11 se trouve alors libéré lié à une courte séquence ADN. Ici, RAD51 et DMC1 sont décrites comme formant des filaments mixtes bien qu'il existe également des preuves que ces deux recombinases forment des filaments distincts. (Shibata *et al.*, 2018)

somatique et que l'on connaît sous le nom de biais inter-homologue (IH). Bien que la formation d'un CO soit obligatoire, dans 95% des cas la réparation mène à un NCO. Les mécanismes qui sont à l'origine de la reconnaissance et du choix de la matrice pour la réparation des CDB sont encore peu connus et ce sont ces mécanismes qui vont déterminer le devenir de la CDB en NCO ou CO (Figure 7).

2.3.2.1 L'étape de résection

Chez la levure et les mammifères, la protéine SPO11 reste fixée de manière covalente aux extrémités 5' des CDB. L'activité nucléolytique du complexe MRX (MRE11/RAD50/XRS2, chez la levure) et MRN (MRE11/RAD50/NBS1, chez les plantes par exemple) avec COM1/SAE2, libère de courts oligonucléotides liés à SPO11 (105). Des analyses fonctionnelles des gènes *Mre11*, *Rad50* et *Com1* de plante ont montré une possible conservation du rôle des protéines encodées par ces gènes dans les premières phases de prise en charge des CDB (Figure 9) (106). Leurs mutants respectifs montrent tous une très forte fragmentation des chromosomes à l'anaphase I, SPO11-dépendante pour les mutants *Atcom1* (107) et *Atmre11* (108). Le mutant *Atcom1* présente aussi une accumulation de la protéine SPO11-1 et ne parvient pas à former des foyers RAD51 (107). La résection induite par les complexes MRX ou MRN va ainsi générer des extrémités 3'-OH simple brin plus longues qui sont ensuite fixées par des protéines RPA, les protégeant de l'activité des endonucléases. Chez les plantes, chaque membre du complexe hétérotrimérique RPA (RPA1, 2 et 3, aussi nommés sous-unités RPA de 70, 32 et 14 kDa, respectivement) (109, 110) est codé par une famille multigénique. Des données génétiques et biochimiques obtenues chez le riz et *Arabidopsis* commencent tout juste à révéler au grand jour le rôle de chacun de ces composants et conduisent à l'idée que plusieurs complexes RPA partiellement redondants coexistent (111–114), certains étant requis pour la méiose. Ensuite, les recombinaisons RAD51 et DMC1 sont chargées sur ces simples

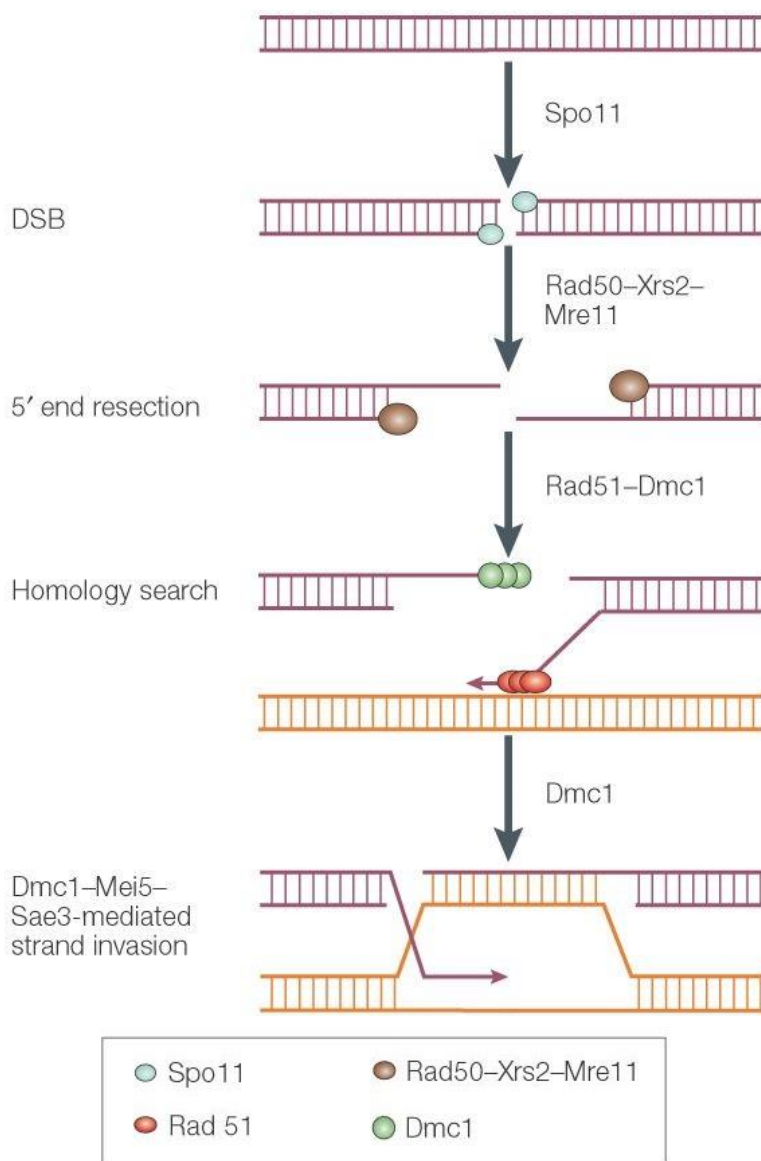


Figure 10 : L'invasion lors de la méiose. La recombinaison méiotique commence par une cassure double-brins (CDB) catalysée par Spo11. Les extrémités 5' de cette cassure sont réséquées, laissant des extrémités 3' simple-brin. Cet ADN est probablement utilisé dans une recherche d'homologie impliquant les homologues de RecA (protéine de recombinaison) Dmc1 et Rad51. Une fois que l'homologue approprié est identifié, Dmc1 commence un événement de recombinaison par croisement en réalisant une invasion stable du chromosome homologue en utilisant l'une des extrémités 3' . (Gerton and Hawley, 2005)

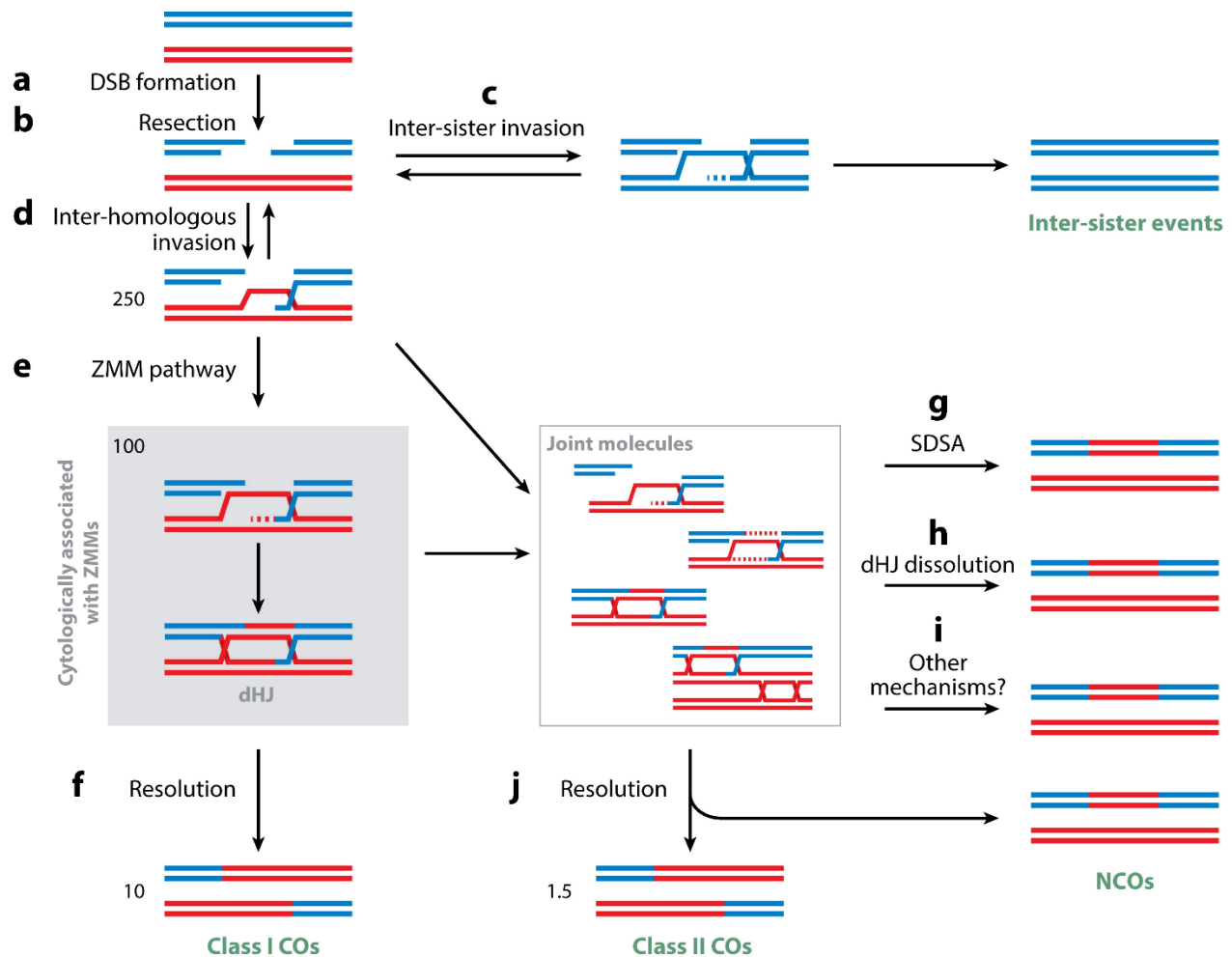
brins pour former des nucléofilaments prêts à effectuer une recherche d'homologie et la formation d'hétéroduplex. Ce complexe va pouvoir ainsi envahir la chromatide sœur ou le chromosome homologue qui lui servira de matrice pour la réparation de la CDB. Cependant plusieurs acteurs peuvent réaliser cette réparation et le devenir de la CDB sera conditionné par la nature de ces acteurs.

2.3.2.2 *L'étape d'invasion*

En mitose, les CDB sont réparées en utilisant la chromatide sœur comme matrice. En revanche en méiose, le chromosome homologue est aussi utilisé pour la réparation de ces CDB (Figure 4). Le choix de la matrice va tout d'abord dépendre de la protéine prenant en charge la recherche d'homologie de séquence pour la réparation. Deux protéines majeures ont été identifiées comme étant responsables de l'invasion de la matrice de réparation, les recombinaisons RAD51 et DMC1 (Figure 10) (13). La stœchiométrie de ces recombinaisons à l'intérieur du nucléofilament est encore discutée, mais des preuves cytologiques récemment obtenues chez *Arabidopsis* suggèrent qu'elles ont tendance à se localiser aux deux extrémités d'une CDB (Figure 10) (115). RAD51 est impliquée dans la réparation des CDB en mitose et en méiose, alors que DMC1 est exclusivement actif durant la méiose. Ainsi RAD51 serait responsable de la réparation des CDB sur la chromatide sœur. Au cours d'une méiose sauvage, la voie prédominante de réparation de l'ADN semblerait se faire grâce au biais IH induit par la protéine DMC1. Dans la levure, comme chez *Arabidopsis*, l'activité catalytique de RAD51 n'est pas obligatoire pour la formation des CO, indiquant que RAD51 fonctionne comme un facteur accessoire de DMC1 pendant la formation des CO (116, 117). En outre, RAD51 fonctionne comme une voie de secours pour réparer les CDB quand DMC1 échoue (115, 118). En l'absence de DMC1, les CDB méiotiques sont efficacement réparées via RAD51, probablement grâce à la chromatide sœur comme matrice de réparation, conduisant à une absence

complète de synapse et de formation de bivalents, mais à une réparation correcte de l'ADN (119, 120). Cependant, lorsque DMC1 est présent, il réprime l'activité de réparation de RAD51 (107), comme chez la levure, où un mécanisme de régulation négatif supprimant la fonction de RAD51 pendant la méiose est connu pour être opérationnel (121, 122). RAD51 et DMC1 partagent 54% d'identité en acides aminés chez l'homme et 45% chez la levure (123). En revanche, un grand nombre de protéines a été identifié comme nécessaires pour le recrutement, la stabilisation et/ou l'activation de l'une ou l'autre. Ces protéines accessoires pourraient donc expliquer les rôles divergents de RAD51 et DMC1 au cours de la méiose. Par exemple, ASY1, l'homologue chez les plantes de la protéine HOP1 de levure, est une protéine axiale qui stabilise DMC1 au cours de la méiose d'*Arabidopsis* mais pas RAD51 et permet une réparation correcte par le biais IH (124). De même, SDS, une protéine plante-spécifique de type cycline D est nécessaire pour le recrutement et/ou la stabilisation de DMC1 (98). De façon similaire, la kinase ATR régule le recrutement de DMC1 sur les sites de CDB (115). La voie de réparation faisant intervenir la chromatide sœur, conduite par RAD51, nécessite probablement aussi des protéines accessoires, dont une serait probablement l'hélicase MCM8 (125). Plusieurs autres protéines sont également susceptibles d'être des cofacteurs de recombinaisons au cours de la méiose, notamment BRCA2 (126, 127) et plusieurs paralogues de RAD51 (XRCC3, RAD51B, RAD51C et RAD51D). Cependant, selon l'espèce, la nécessité de l'un ou l'autre de ces paralogues de RAD51 pour la réparation des CDB de l'ADN semble varier. Par exemple le paralogue RAD51D semble ne pas avoir de fonction chez *Arabidopsis thaliana* alors qu'il interviendrait dans la réparation des CDB chez le riz.

Une fois l'étape d'invasion réalisée, une structure spéciale prend forme, appelée double jonction de Holliday (double Holliday junction, dHj). C'est la résolution de cette structure qui donnera lieu soit à un CO soit à un NCO.



AR Mercier R, et al. 2015.
 Annu. Rev. Plant Biol. 66:297–327

Figure 11 : Modèle des mécanismes de recombinaison méiotique. La recombinaison méiotique est initiée par la formation d'un grand nombre de cassures double-brins (CDB) (a) qui sont traitées (b) pour donner des extrémités 3' simple brin. Cet ADN peut alors envahir la chromatide sœur intacte (c) ou l'une des deux chromatides homologues, formant une D-loop (d). Les intermédiaires inter-homologues peuvent être protégés par des composants de la voie ZMM (e), générant des intermédiaires à double jonction de Holliday (dHJ) pouvant être résolus en crossover de classe I (CO) (f). Alternativement, les intermédiaires peuvent être transformés en non-crossovers (NCO) via différents mécanismes, y compris par hybridation et synthèse sur l'autre brin (SDSA) (g), la dissolution de dHJ (h) et éventuellement d'autres mécanismes (i). De plus, une voie indépendante de celle des ZMM produit des CO de classe II (j). Le nombre estimé de chaque intermédiaire dans *Arabidopsis thaliana* est indiqué. (Mercier *et al.*, 2015)

2.3.2.3 Les voies de formation des CO

Au cours des quinze dernières années, la découverte de l'existence de deux voies pour la formation de CO de classe I ou II, suivant l'étape d'invasion chez la plupart des eucaryotes a été une avancée majeure (Figure 11).

2.3.2.3.1 CO de classe I : voie des ZMM

La première voie repose sur un groupe de protéines initialement identifiées chez la levure et appelées collectivement les ZMM (Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Mer3, Msh4 et Msh5). Dans les mutants *Arabidopsis Atmsh4*, *Atmsh5*, *Atshoc1* (*zip2*), *Athei10* (l'homologue fonctionnel probable de Zip3), et *Atzip4*, et dans des combinaisons de ceux-ci, le nombre de CO est fortement réduit mais non-nul (environ 15% du nombre de CO détectés chez le sauvage) (75–77, 128–130). Dans le mutant pour le gène Ptd nous observons la même baisse du nombre de CO. Ptd code pour ce qui semble être une protéine de type ZMM, spécifique à la plante, qui forme un dimère avec SHOC1/ZIP2 ressemblant à celui formé entre XPF et ERCC1 (77, 131). Etrangement, à la différence des autres mutants pour les autres gènes ZMM, le mutant d'insertion *Atmer3* montre un niveau légèrement plus élevé de la fréquence résiduelle de CO (~25%) (132). Cependant, en combinant la mutation *Atmer3* avec une autre mutation *zmm*, la fréquence résiduelle des CO revient aux 15% observés dans les simples mutants et les combinaisons de mutants des gènes ZMM (21, 77, 132). De l'analyse de ces doubles mutants, il en ressort qu'une partie des CO résiduels chez le mutant *Atmer3* est dépendantes de AtMSH5. De la même façon, chez le riz, le simple mutant *Osmsh5* a une fréquence résiduelle de CO d'environ 10% (133). Les mutants simples *Oszip4*, *Osmer3* et *Oshei10* ont des fréquences résiduelles de CO d'environ 30%, ce qui suggère que ces gènes ont un impact moindre dans cette voie (134–137). Néanmoins la preuve que ces mutants sont complètement KO n'est pas explicite. Lorsque plusieurs de ces mutations sont combinées, le niveau de CO diminue

jusqu'à atteindre les 10% mais ne diminue pas davantage (133, 135–137). Il est donc clair que la voie ZMM est la voie principale de formation des CO mais elle n'est pas unique, puisqu'elle ne représente que 85 à 90% des CO. Bien qu'elles ne soient pas considérées comme des protéines ZMM, deux autres protéines conservées, MLH1 et MLH3, agissent dans cette voie à la fin de la recombinaison méiotique pour la résolution des dHj (Figure 11). Les mutants *mlh1* et *mlh3* d'*Arabidopsis* ont donc un phénotype moins prononcé que les mutants *zmm*, avec une fréquence de CO réduite à environ 50% par rapport au sauvage (76, 138), les liaisons physiques (chiasma) entre chromosomes homologues étant déjà établies. Cependant les doubles mutants *mlh3/zmm* et *mlh1/zmm* ne montrent pas de différence phénotypique par rapport aux mutants simples *zmm* (139) (M. Grelon, données non publiées). Chez le mutant *mlh3/des10* de l'orge, le nombre de CO est aussi réduit mais n'est pas nul (140). Contrairement à MLH1, qui marque spécifiquement les CO de la voie ZMM en fin de prophase (141), les protéines MSH5, ZIP4, MER3 et HEI10 de plantes forment de nombreux foyers (plus de dix fois le nombre d'éventuels CO) au début de la prophase (leptotène-zygotène). Alors que les autres foci ZMM disparaissent lors du pachytène (128, 129, 133, 135–137), HEI10 se concentre dans un nombre limité de foci qui colocalisent avec MLH1 et les chiasmas de la fin du pachytène à la diacinèse (76, 137). Ainsi, parmi de nombreux intermédiaires de recombinaison précoce traités par les ZMM, seuls quelques-uns évoluent progressivement en CO marqués par des foci tardifs HEI10 et MLH1.

2.3.2.3.2 CO de classe II : Voie indépendante des ZMM

Paradoxalement, on en sait beaucoup moins sur les acteurs moléculaires des voies de formation des CO ne faisant pas intervenir les ZMM dans les plantes. MUS81 est le seul acteur qui ait été caractérisé (Figure 11). Cette protéine possède un domaine ERCC4 ayant une fonction d'endonucléase (142). Elle agit en complexe avec les protéines EME1 et EME2 pour former un

complexe hétérodimérique ayant une fonction endonucléase spécifique de structures ADN ayant une forme de fourche de réplication bloquée. Dans la résolution des CO de classe II, ce complexe va permettre de prendre en charge des jonctions de Holliday simples (Hj). L'intervention d'un autre complexe avec MUS81, SLX1-SLX4, permettrait la résolution des Hj en NCO. Le fait de muter le gène MUS81 réduit le nombre de CO d'environ 10% par rapport au contexte sauvage et élimine environ un tiers des CO restant dans un fond mutant *zmm* (77, 78, 129). Cela prouve que MUS81 est responsable d'une partie des CO non induits par la voie ZMM, mais il n'y a encore aucune explication concernant l'origine des CO restant. La protéine MUS81 possède un domaine XPF assez fréquent et d'autres protéines pourraient ainsi prendre le relais. La protéine RAD1/XPF1/MEI-9, qui est impliquée dans la formation de CO chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans* (143, 144) semble être un bon candidat pour expliquer l'origine des CO restant. Cependant, la protéine AtXPF1 ne semble pas avoir de fonction durant la méiose, que ce soit dans un fond sauvage ou un fond mutant *zmm* (125). Deux autres candidats pour expliquer l'origine des CO restant sont les nucléases GEN1 et SLX1, impliquées dans la formation des CO non induits par la voie ZMM chez la levure (145). Ces deux nucléases ont des homologues présents dans les génomes des plantes (146) mais ceux-ci n'ont pas été caractérisés fonctionnellement.

2.3.2.4 Les voies de formation des NCO

Dans 95% des cas, suite à la résection et à l'invasion du chromosome homologue (et la formation de la dHj), la réparation de la CDB donne lieu à un NCO (Figure 11). Cela peut passer par la simple ligation des brins d'ADN réséqués après déstabilisation de la D-loop (ou NHEJ, Non-Homologous End-Joining), par la dissolution ou la résolution de la dHj et par l'intervention d'antirecombinases avant la formation de la dHj entraînant la formation d'un NCO par la voie dite SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing). Le mécanisme de NHEJ fait intervenir la protéine KU70/80 ayant

une activité nucléase et étant capable de recruter des ligases (147). Chez *Arabidopsis*, la topoisomérase III α (TOP3 α) et la protéine associée AtBLAP75/AtRMI1 sont toutes deux nécessaires pour parfaire la recombinaison (148, 149) et sont responsables de la dissolution de la dHj. Dans les mutants pour les gènes codant ces deux protéines, les chromosomes homologues sont connectés en métaphase I par des liaisons dépendant de SPO11. Ces liaisons sont par contre indépendantes des protéines ZMM et l'anaphase I devient le siège d'une fragmentation chromosomique, ce qui suggère que les intermédiaires de recombinaison nécessiteraient alors une activité topoisomérase simple-brin pour que ceux-ci soient résolus en NCO (150). L'hélicase RECQ4 (RECQ4A, RECQ4B) empêche la formation de CO de la même façon en dirigeant les intermédiaires de recombinaison et en agissant sur la dissolution des dHj. Dans le double mutant *recq4a/recq4b*, la fréquence de formation des CO de classe II augmente jusqu'à six fois par rapport au sauvage (151). Comme dit précédemment dans le chapitre 2.3.2.3.2, la protéine MUS81 peut permettre la résolution des dHj en NCO grâce à des partenaires particuliers comme le complexe SLX1-SLX4 ou encore la protéine MMS4 (152, 153). La voie de formation principale des NCO est la voie dite SDSA faisant intervenir l'hélicase AtFANCM et ses deux cofacteurs MHF1 et MHF2 (25, 154, 155). Dans le simple mutant *Atfancm* la fréquence de formation des CO augmente trois fois par rapport au sauvage. Comme pour RECQ4, ces CO supplémentaires sont de classe II, ce qui suggère que chez le sauvage, FANCM dirige aussi les intermédiaires de recombinaison vers la voie des NCO (Figure 11). Une troisième hélicase intervenant dans le SDSA est RTEL. Cette protéine qui limite les CO chez *C. elegans*, existe chez les plantes mais n'a pas été caractérisée. Il existe certainement d'autres voies de formation des NCO mais celles-ci sont encore très peu connues. Par exemple, la protéine FIDGETIN-Like-1 (FIGL1) empêche également la formation des CO de classe II indépendamment de FANCM en empêchant la formation d'un complexe inter-homologue aberrant par la régulation d'intermédiaires d'invasion, dont la résolution par MUS81 (et

éventuellement d'autres facteurs) conduit à la formation de CO supplémentaires (154) (Figure 11). Enfin, XRCC2 et RAD51D, deux paralogues de RAD51, semblent limiter également la formation de CO, probablement en régulant l'étape d'invasion catalysée par DMC1 et RAD51 (117).

Ainsi, alors que réparation des CDB en au moins un CO lors de la méiose est une obligation afin de permettre la formation de gamètes viables chez la plupart des espèces et notamment chez les plantes, il apparaît que ce processus est en fin de compte rare et contrôlé par une multitude de mécanismes. De la compréhension de ces mécanismes moléculaires découle la possibilité d'agir et de contrôler la recombinaison méiotique et le devenir des CDB.

2.4 Modification et amélioration de la recombinaison

La recombinaison méiotique est maintenant reconnue comme étant le facteur principal permettant un brassage génétique pour l'apparition de nouvelles combinaison d'allèles et donc de nouvelles variétés. En effet ce phénomène est depuis longtemps exploité lors des programmes de sélection variétale, mais sous sa forme simple, ou naturelle, et aléatoire. Deux parents ayant des caractères intéressants sont croisés et leur descendance est étudiée afin de trouver l'évènement résultant du brassage génétique lors de la méiose présentant la combinaison de trait la plus intéressante. Son contrôle et sa manipulation deviennent alors stratégiques dans l'élaboration de nouvelles variétés, regroupant des caractères agronomiques intéressants et qui ne peuvent être réunis dans le même individu grâce aux méthodes classiques de sélection. Depuis longtemps, plusieurs essais ont été menés afin de pouvoir modifier la répartition et la fréquence d'apparition des CO.

2.4.1 Agir sur la méthylation

Les mutants pour les gènes *Met1* et *Ddm1* montrent une déficience dans le maintien de la méthylation de l'ADN résultant en une hypométhylation dans le génome. Ces changements ont pour conséquence une redistribution des CO dans les parties distales des chromosomes. De manière surprenante, alors que l'absence de méthylation rend la chromatine plus accessible, cela ne conduit pas à l'augmentation du nombre de CO. Le nombre total de CO ne change pas, ce qui suggère que la méthylation de l'ADN influence uniquement la répartition de CO (72, 156–158). L'identification de gènes par l'intermédiaire desquels il est possible de modifier la fréquence et la distribution de la recombinaison ouvre des perspectives intéressantes. Cependant, alors que l'on peut aujourd'hui changer le patron de répartition de la recombinaison méiotique de manière aléatoire, on ne peut toujours pas la relocaliser précisément. On pourrait alors imaginer manipuler des facteurs

potentiellement responsables du choix du site d'apparition des CO. PRDM9 étant absent chez les plantes, un candidat tout à fait désigné serait alors un membre du complexe responsable des cassures double-brins à l'origine des CO.

2.4.2 Bloquer la voie des NCO et réduire l'interférence

Chez *Arabidopsis thaliana*, 90% des crossovers sont de type I (soumis à l'interférence, voie des ZMM) et 10% sont de type II (non soumis à l'interférence). Sur environ 250 cassures double-brins, seulement 10 seront résolues en crossover. Le reste sera soit résolu grâce à la chromatide sœur, soit en NCO. La voie des NCO est régie par plusieurs facteurs comme FANCM, TOP3a, FIGL1 ou la famille des RECQ4 (RECQ4A et RECQ4B). Cette dernière est à l'origine de la déstabilisation de la boucle D (ou d-loop, à l'origine de la dHJ). Dans les mutants pour ces gènes, des CO de classe II dépendant de MUS81 sont distribués dans les parties distales (25, 155, 159), alors que les CO de classe I semblent ne pas être affectés. Parallèlement, une multiplication du nombre de copies du gène HEI10 favorise la formation de CO de classe I (151). L'association des deux (HEI10 multicopies et RECQ4 (A et B) mutés) dans un croisement biparental augmente la recombinaison (et les CO) d'un facteur 5. La distribution de l'augmentation du nombre de crossovers n'est pas hétérogène et a lieu essentiellement aux télomères. Les centromères sont très peu affectés et certaines régions présentent une augmentation supérieure à 5 fois. Malgré ceci, le nombre de CDB reste inchangé malgré l'augmentation du nombre de CO. Le phénotype des plantes se traduit par une légère diminution de la viabilité du pollen (-5%) et une baisse significative du nombre de graines par silique (-30%). Il a été montré par ailleurs que les CO nouvellement formés ne sont pas forcément localisés là où les CDB sont les plus fréquentes.

Trois autres protéines ont été identifiées comme étant responsables de la répartition des CO : PCH2, remodelant les axes chromosomiques et retirant ASY1 (160), AXR1, une enzyme du complexe de neddylation (161) et PSS1, une protéine similaire à une kinésine, impliquée dans la machinerie de mobilité des chromosomes (162). De façon tout à fait intéressante, les mutants pour ces gènes montrent une répartition des CO modifiée associée à une synapse défectueuse. Seul le mutant *pch2* accuse une diminution du nombre de CO alors que chez les autres il reste inchangé. Les CDB se forment sans encombre mais l'interférence est altérée dans quelques régions des chromosomes. Alors que les mécanismes sous-jacents restent encore peu connus, le fait que la synapse soit impactée chez tous ces mutants, suggère l'importance d'une synapse complète pour la régulation de la maturation des intermédiaires de recombinaison en CO. Une perte de cette régulation aurait pour conséquence une mauvaise localisation des CO de classe I.

Les différentes avancées dans l'amélioration de la recombinaison méiotique permettent augmentation importante de celle-ci mais centrée essentiellement sur des régions qui recombinent déjà. Il devient alors nécessaire de découvrir de nouvelles stratégies pour délocaliser la recombinaison.

2.4.3 Le ciblage de la recombinaison

Les multiples découvertes sur le processus méiotique lors de ces dernières années ont vu l'apparition de nombreuses techniques dans le domaine appliqué (125). Malgré une augmentation constante des connaissances concernant les mécanismes moléculaires derrière le processus méiotique, notamment chez les végétaux, il reste encore de nombreuses questions en suspens. Celle soulevant le plus d'interrogations concerne la localisation des CDB qui seront réparées en CO.

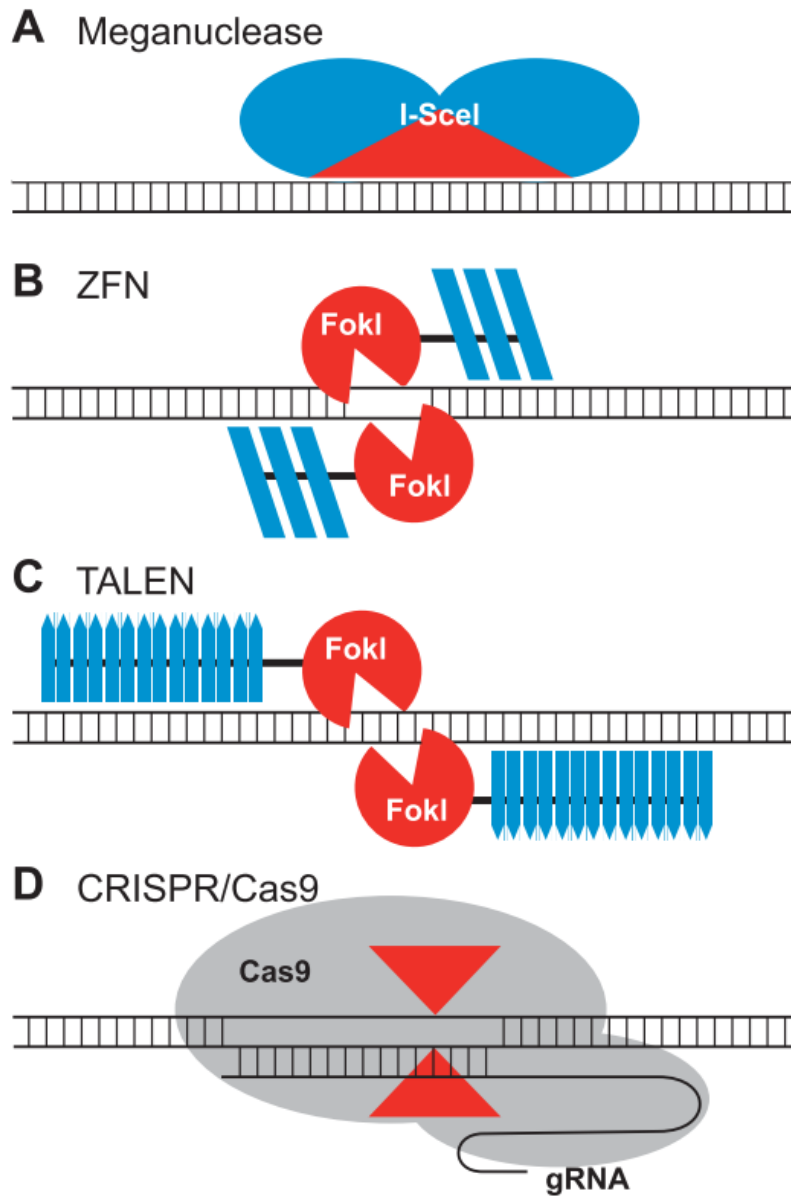


Figure 12 : Schémas des quatre classes de nucléases à séquence spécifique. (A) La méganucléase, I-SceI, est liée à son ADN cible. Le domaine catalytique, qui détermine également la spécificité de la séquence d'ADN, est indiqué en rouge. (B) Un dimère de protéines de doigts de zinc (ZFN) est illustré lié à l'ADN. Les cibles ZFN sont liées par deux domaines de liaison à l'ADN à doigts de zinc (bleu foncé) séparés par une séquence de 5 à 7 pb dans laquelle le clivage FokI se produit. Chaque doigt de zinc reconnaît généralement 3 pb. (C) Un dimère TALEN lié à l'ADN est représenté. Les domaines de liaison à l'ADN sont en bleu foncé. Les deux sites cibles TALEN sont généralement séparés par une séquence de 15 à 20 pb. Comme les ZFN, les répétitions de motifs de l'effecteur TAL sont fusionnés avec FokI. Chaque motif effecteur TAL reconnaît une base. (D) Le système CRISPR / Cas9 reconnaît l'ADN par l'association de bases entre les séquences d'ADN sur le site cible et un ARN guide (ARNg). Cas9 possède deux domaines de nucléase (représentés par les flèche rouges) qui coupent chacun un brin de l'ADN double brin. (Voytas *et al.*, 2014)

2.4.3.1 Les domaines de liaison à l'ADN

Les domaines de liaison à l'ADN ont été depuis longtemps utilisés en biologie synthétique pour modifier ou altérer l'expression d'un gène par exemple (163). La spécificité du domaine de liaison à l'ADN est alors cruciale pour un ciblage de précision. Il existe différents systèmes permettant de cibler certaines régions du génome : les méganucléases, les protéines en doigts de zinc (ZF), les TALEs, et le système CRISPR/CAS9 (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) (Figure 12) (164).

2.4.3.1.1 Méganucléases

Le ciblage de l'ADN, peut être réalisé en utilisant des nucléases à séquence spécifique (ou sequence-specific nucleases, SSN). Ce sont des enzymes capables de reconnaître précisément une séquence unique d'ADN. Les méganucléases sont des enzymes naturelles qui se lient à de grandes séquences d'ADN (de 12 à 40 pb) (165, 166) et qui peuvent être conçues artificiellement pour reconnaître de nouveaux sites. Cependant, il est difficile d'obtenir des changements dans la spécificité du site cible et cela conduit souvent à une réduction de l'activité catalytique, ce qui a empêché leur généralisation (166). Le premier exemple d'utilisation des méganucléases a été réalisé sur des cellules humaines pour le ciblage de mutations (167). Chez les plantes, cette technologie a été efficacement utilisée chez le coton pour l'insertion dirigée de transgènes (168) ainsi que dans *Nicotiana glauca* pour la réalisation de courtes délétions (169). Récemment, cette technologie a été utilisée pour la réalisation de délétions ciblées chez le blé tendre (170). Cependant la customisation d'une méganucléase reste extrêmement coûteuse et doit être réalisée à chaque changement de cible.

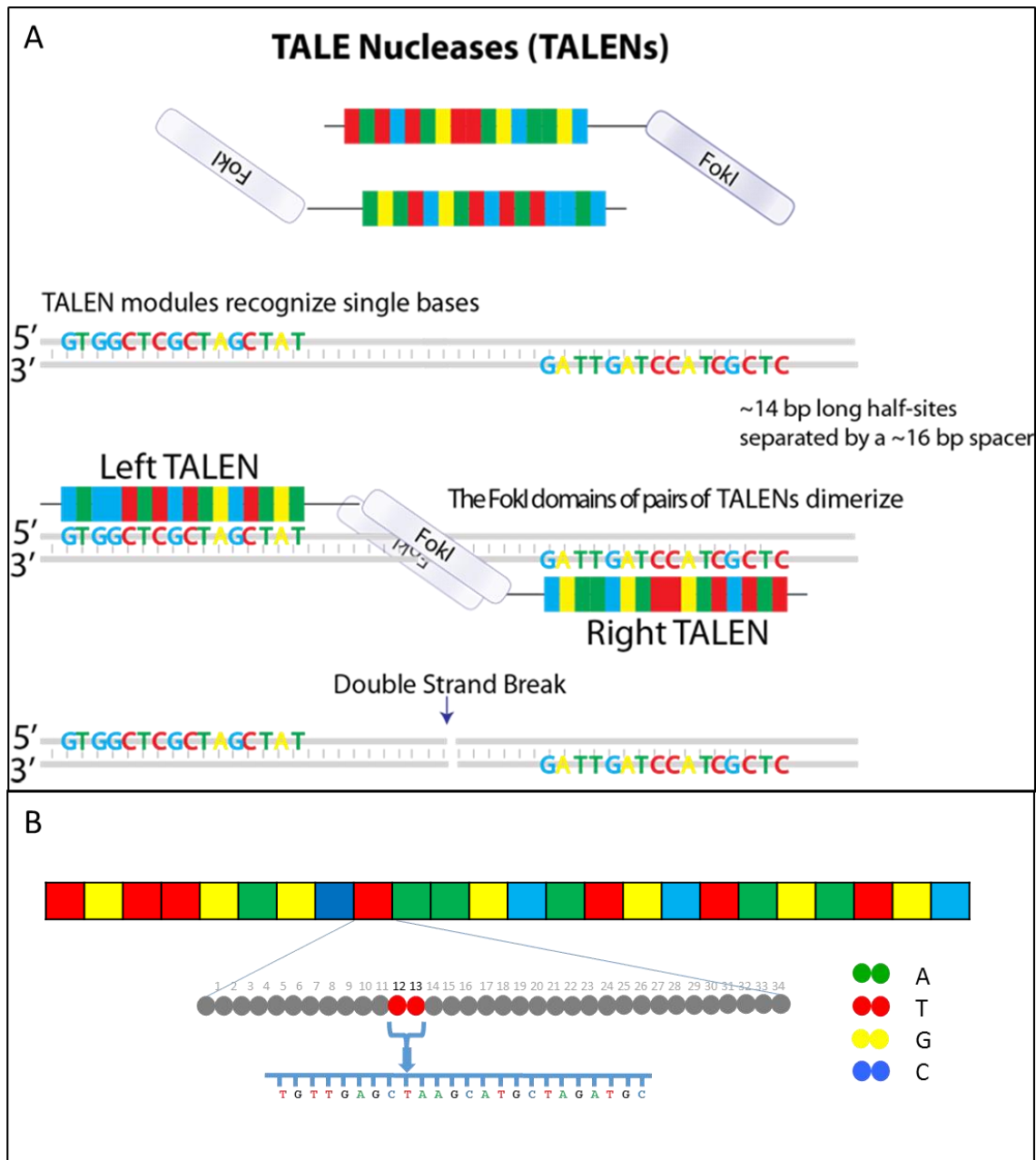


Figure 13 : Les TALEN. Les TALEN (transcription activator-like effector nuclease) sont un outil moderne de génie génétique permettant d'effectuer des coupes précises de brins d'ADN à pratiquement n'importe quelle position du génome. Ces enzymes construites artificiellement consistent en un domaine de liaison à l'ADN oligopeptidique à forte variabilité de séquence (TAL), modélisé ici sous la forme d'une succession de briques de couleur, et un domaine de restriction FokI qui coupe la séquence encadrant un site de liaison (A). FokI agissant en dimère, les TALEN sont souvent utilisés par deux. Ils permettent d'éditer avec précision des séquences in situ et d'introduire tout type de mutations ponctuelles, de délétions, d'additions. (B) Le domaine TAL est constitué d'une succession de répétitions (ici 24), chacune composée de 34 acides aminés identiques entre toutes les répétitions sauf le 12^{ème} et 13^{ème} qui eux vont former des combinaisons spécifiques de chacun des quatre acides nucléiques. (<https://cebiotech.com/articles/A-talen-t-for-treating-leukaemia,380>)

2.4.3.1.2 Protéines en doigts de zinc (ZF)

Historiquement, des systèmes comme les motifs helix-turn-helix, leucine zipper ou zinc finger (ZF) ont aussi été utilisés (171). Ce dernier a d'ailleurs été le plus utilisé pour l'activation ou la répression de la transcription, étant donné le fait qu'il reconnaît des cibles de tailles variables. Cette protéine agit en monomère grâce à deux bras composés de 3 à 6 (et même jusqu'à neuf) doigts C2H2 (172) ciblant une séquence allant de 9 à 18pb. Ceci en fait un excellent outil pour cibler des sites uniques dans des génomes complexes. Ces protéines ont été utilisées chez les plantes pour des délétions chromosomiques ciblées (173, 174), des délétions de transgènes (175, 176) et des intégrations d'ADN ciblées (177, 178). Récemment, cette technologie a été utilisée pour éditer efficacement les 3 copies homéologues du gène *Ahas* (Acetohydroxyacide synthase) chez le blé tendre (179). Cependant pour trouver la protéine spécifique du site que l'on étudie, un criblage minutieux et fastidieux des banques de protéines ZF doit être réalisé (180).

2.4.3.1.3 TALE

Les TALE (Transcription Activator-Like Effectors) (163, 181) ont une affinité supérieure mais aussi une plus grande flexibilité. Cette protéine a été découverte chez la bactérie pathogène *Xanthomonas* et contient un domaine de translocation en position N-terminal, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine d'activation en C-terminal (182, 183) (Figure 13). Les premiers domaines identifiés de liaison à l'ADN des TALE se fixent aux promoteurs des gènes cibles sur des sites spécifiques, appelés boîtes UPT (UP régulées par les TALE). Un autre type de domaine de liaison à l'ADN des TALE existe et est composé de 1,5 à 33,5 (la plupart du temps entre 15,5 et 19,5) répétitions quasi identiques d'une longueur de 30 à 42 (typiquement 34) acides aminés (184). La spécificité de chaque répétition provient d'une paire d'acides aminés (ou repeat-variable

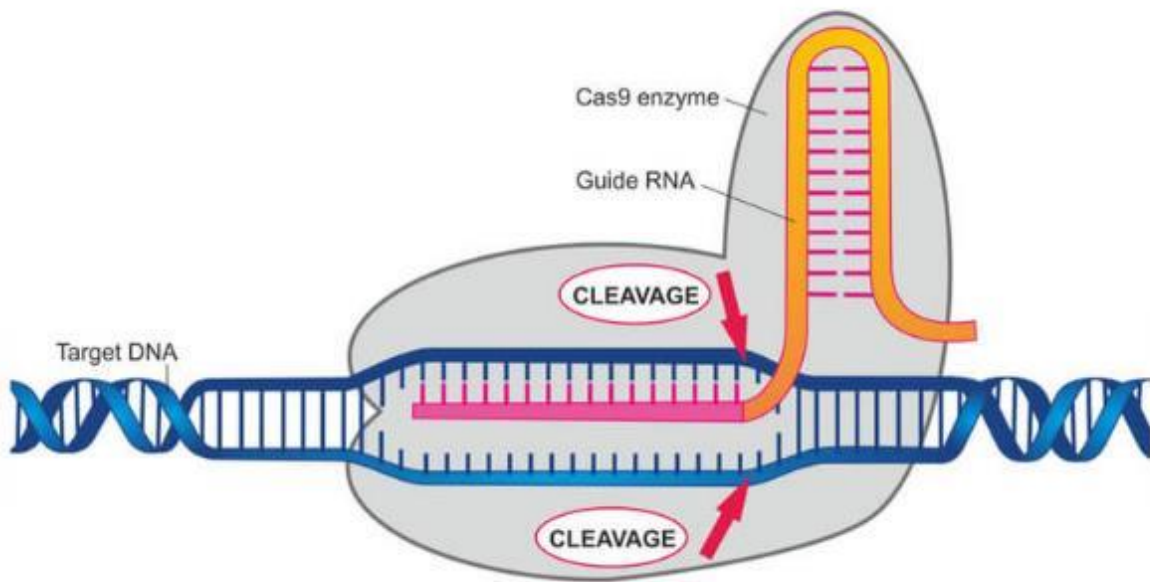


Figure 14 : Le système CRISPR/Cas9. Ce système est constitué des deux éléments, une endonucléase (Cas9) qui est capable de réaliser des cassures double-brins de l'ADN grâce à deux sites catalytiques, et un guide ARN comportant une partie complémentaire de la cible présente sur le brin d'ADN que l'on souhaite couper. (<https://labiotech.eu/features/crispr-cas9-review-gene-editing-tool/>)

di-residues, RVD) aux positions 12 et 13 (Figure 13), dont les quatre combinaisons les plus courantes sont NI, NG, HD et NN, se liant spécifiquement aux nucléotides A, T, C et G, respectivement (163, 185–187). Il est alors possible de prédire ces domaines de liaison à l'ADN, chaque répétition étant indépendante des autres (185, 186). En organisant à façon les répétitions liant l'ADN, on peut ainsi créer de nouvelles protéines synthétiques TALE répondant parfaitement à des besoins spécifiques de ciblage de l'ADN (Figure 13). Liu *et al* en 2014 (188) ont ainsi appliqué ce système pour le ciblage et l'activation d'un gène rapporteur visible, AtPAP1, ce qui a entraîné une production élevée d'anthocyanes. L'activation de l'expression de AtPAP1 par des TALE synthétiques a pu modifier la couleur des feuilles de tabac transgénique, passant du vert au violet foncé. Une autre étude chez le blé cette fois-ci, a montré la possibilité de muter simultanément trois copies homéologues d'un gène de sensibilité à l'oïdium, conférant ainsi une résistance héritable, grâce à des CDB induites par une endonucléase dirigée vers ces trois gènes par des TALE (189). Cette étude prouve ainsi l'effectivité et l'efficacité des TALE chez le blé tendre.

Malgré cette grande flexibilité, la production à façon de séquence plasmidique codant pour une protéine TALE reste onéreuse (entre 1000 et 2000 euros par protéine). D'autres études ont aussi montré que le domaine de liaison à l'ADN des protéines TAL est sensible à la méthylation de cytosines, réduisant fortement, voire supprimant, l'affinité de la protéine à l'ADN (190, 191).

2.4.3.1.4 Les CRISPR

Le système CRISPR CAS9 cible la séquence voulue grâce à un ARN guide qui va se lier avec une cible ADN de manière spécifique (Figure 14) (192, 193). La protéine CAS9 va ensuite cliver ce complexe ARN/ADN. Le ciblage de l'ADN grâce à une courte séquence ARN évite ainsi de devoir concevoir une nucléase séquence spécifique *de novo* à chaque fois que l'on change de cible, ce qui

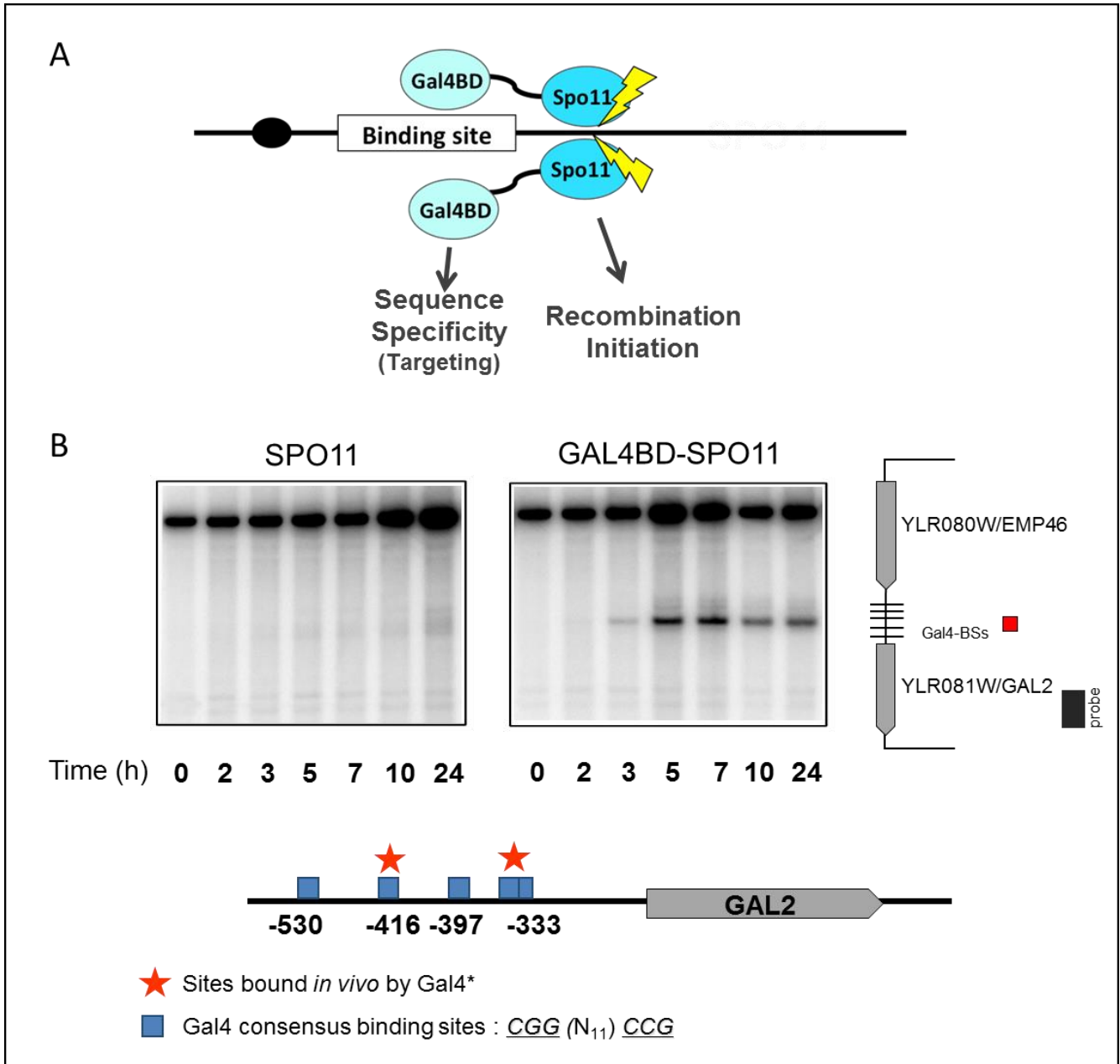


Figure 15 : Stimulation dirigée de la recombinaison méiotique chez la levure. (A) La protéine SPO11 de levure est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN. (B) Formation de cassures double-brins au locus GAL2. L'ADN a été digéré avec les enzymes XbaI et NcoI et hybridé avec une sonde dessinée dans le locus GAL2. (Peciña *et al.*, 2012)

en fait rapidement un système de ciblage de choix à moindre coût. Ce système a commencé à être utilisé chez les plantes en 2013 (194). Nekrasov *et al* en 2013 (195) ont démontré l'utilisation du système CRISPR/CAS9 pour de la mutagenèse dirigée chez *Nicotiana benthamiana*. Dans la foulée, la technologie a été montrée comme efficace pour la mutagenèse dirigée chez le riz et le blé tendre (193). La plupart des premiers essais faits sur les plantes se focalisait essentiellement sur l'utilisation de ce système en expression transitoire en protoplastes et *in planta*. Quelques-uns ont donné des plantes portant des mutations au locus ciblé (189, 194, 196). Au fil des années, d'autres utilisations de ce système pour l'édition du génome du blé et d'autres plantes de grandes cultures par mutagenèse dirigée (189, 197, 198). Parallèlement, avec la démocratisation de l'utilisation de ce système chez les plantes, la protéine CAS9 s'est vue modifiée et optimisée afin de répondre aux besoins des chercheurs et depuis de nombreuses preuves de l'utilisation efficace du système CRISPR/CAS9 pour l'édition du génome du blé et d'autres plantes de grandes cultures ont été publiées (197, 199).

2.4.3.2 *SpiX, une technologie de ciblage de la recombinaison*

Peciña *et al.* en 2002 (200) ont publié des résultats mettant en avant la stimulation ciblée de la recombinaison méiotique chez la levure. Dans cette étude, les auteurs ont dirigé la protéine SPO11 dans une zone normalement dépourvue de CO en la fusionnant avec le domaine de liaison à l'ADN GAL4-BD, la partie de liaison à l'ADN de la protéine de levure GAL4 fixant une séquence consensus de 17 pb (CGGN₁₁CCG) appelée UAS_{GAL} (upstream activator sequence) (201) (Figure 15). En exprimant cette construction pendant la méiose, les auteurs ont pu ainsi déterminer que la fusion GAL4BD-Spo11 stimule effectivement la formation de CDB dans la zone ciblée et que les CDB sont associées à de la recombinaison à côté des sites UAS_{GAL} et d'autres sites fixant GAL4,

même dans des régions connues pour être froides (ne présentant habituellement pas de CDB et donc pas de recombinaison). Une souche déficiente pour le gène Spo11 (*spo11Δ*) dans laquelle est inséré la fusion GAL4BD-Spo11 montre une expression de cette construction en méiose et celle-ci rétablie la viabilité des spores. Ceci implique que cette fusion protéique va pouvoir induire la formation de CDB. Les auteurs ont ainsi montré que ces CDB sont induites au niveau de sites présentant naturellement des CDB dans la souche sauvage (ce qui explique la complémentation du mutant), mais aussi aux cibles du domaine de liaison à l'ADN, GAL4BD et dans des régions naturellement froides comme le locus Gal2 (jusqu'à 20 fois) (Figure 15). Cette stimulation est aussi détectée dans trois autres locus (Gal1, 7 et 10). En analysant des mutants pour d'autres gènes méiotiques complémentés avec la fusion GAL4BD-SPO11, ils ont pu voir que ceux-ci ne présentaient aucune CDB, indiquant que cette fusion est dépendante d'autres partenaires nécessaires à la formation des CDB, les mêmes que ceux interagissant avec SPO11. Enfin, ils ont pu démontrer que les évènements de conversion génique étaient 10 fois plus important dans la souche contenant la fusion GAL4BD-SPO11. Les CDB ainsi induites par cette protéine de fusion se comportent comme des CDB induites naturellement par SPO11 et sont prises en charge par les protéines responsables de l'invasion et réparées naturellement selon les différentes voies de formation des CO ou des NCO. Ces résultats fournissent une des premières preuves que la fréquence de recombinaison homologue durant la méiose peut être augmentée à un site précis par simple modification de la protéine SPO11. Le fait ici d'associer un domaine de liaison à l'ADN à SPO11, fournit un outil polyvalent, adaptable et surtout simple à utiliser étant donné qu'il fait intervenir les mécanismes naturels de formation et de réparation des CDB par la recombinaison homologue, produisant ainsi une descendance viable. Outre sa simplicité, il devient évident que la possibilité de pouvoir aller cibler la recombinaison méiotique nous rapproche sensiblement de la possibilité de rompre les liaisons négatives entre les gènes.

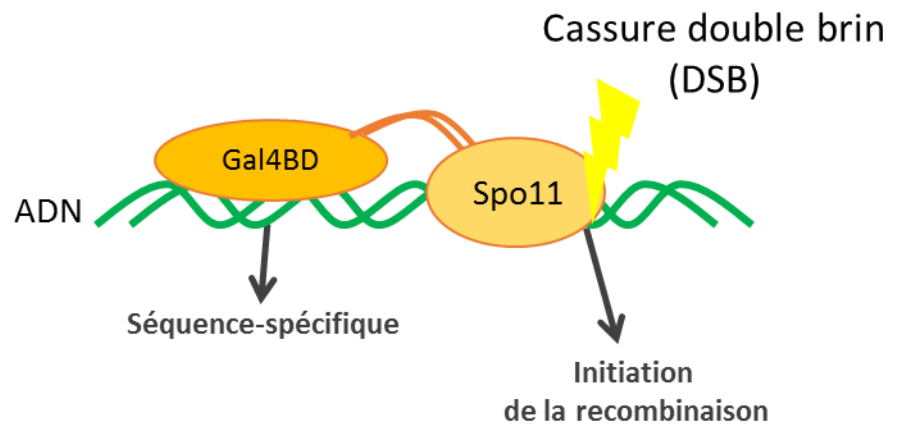


Figure 16 : la technologie SpiX développée chez la levure et exploitée par la société MeioGenix. La protéine SPO11 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN Gal4BD. (www.meioGenix.com)

Les résultats de cette étude ont planté le germe d'une nouvelle biotechnologie, SpiX, exploitée par la société MeioGenix (Figure 16, <http://www.meioGenix.com/>). A l'instar de cette étude, les nombreuses technologies développées pour la modification de la recombinaison l'ont été dans des organismes sans grand intérêt commercial (agriculture, industrie chimique, etc.). C'est ainsi que la société MeioGenix a décidé de mettre en place un programme permettant l'adaptation de la technologie SpiX sur des espèces de grande culture, à savoir, le riz, le maïs et le blé. Cette approche est prometteuse mais elle nécessite une bonne connaissance de l'acteur principal, la protéine SPO11.

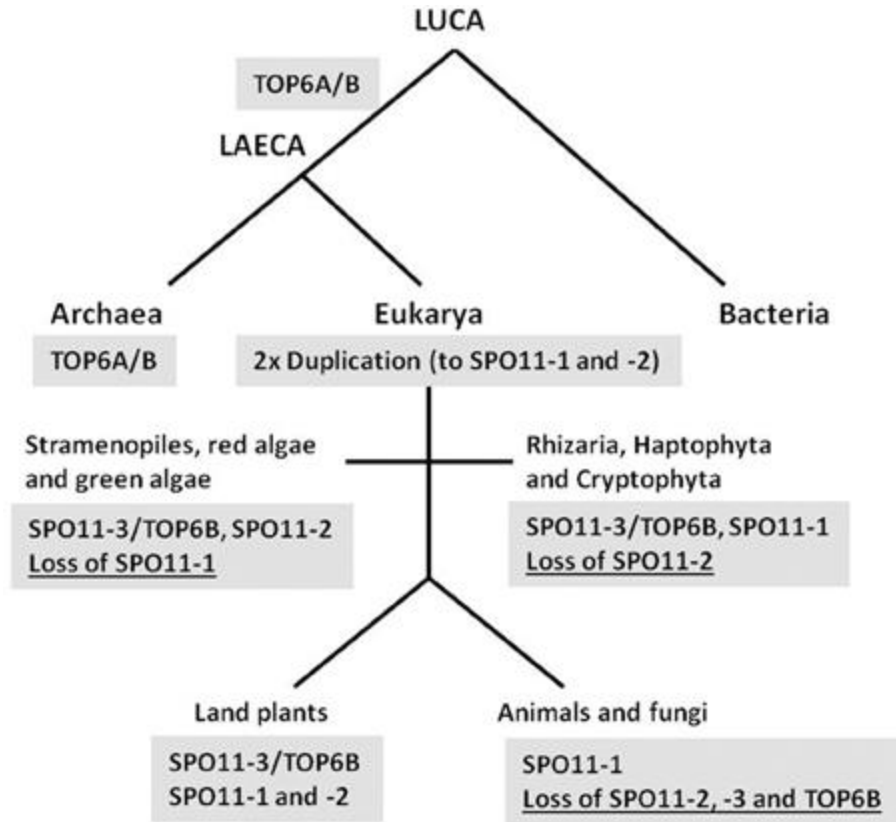


Figure 17 : Schéma d'évolution de SPO11: deux duplications et différents événements de perte. L'évolution proposée des trois gènes SPO11 que l'on trouve aujourd'hui chez les plantes terrestres est schématisée. Alors que les bactéries ne possèdent pas de topoisomérase 6, LAECA a développé une topoisomérase de type 6 dont la sous-unité TOP6A est orthologue de SPO11-3 chez les eucaryotes. Deux événements de duplication du gène SPO11-3 se sont produits après la séparation eucarya (ou eucaryotes)/archées, ce qui a entraîné la création des gènes SPO11-1 et SPO11-2. Dans différents phylums, des événements de perte de SPO11-1 ou -2 se sont produits. Ensuite, après la séparation des règnes animal et fongique, les gènes SPO11-2 et -3 ainsi que TOP6B ont dû être perdus, ce qui entraîne la présence du seul gène SPO11 dans ces deux règnes. Abréviations: LUCA, dernier ancêtre commun universel; LAECA, dernier ancêtre commun archaeal-eucaryal. (Sprink and Hartung, 2014)

2.5 SPO11, un acteur majeur de la technologie SpiX

2.5.1 Phylogénie

SPO11 est une endonucléase montrant une forte homologie avec la sous-unité A de la Topoisomérase VI d'archée (TOPVIA). C'est un des facteurs clés induisant la formation des cassures double-brins (CDB) à l'origine de la recombinaison homologue dans un très grand nombre d'organismes, de l'homme à *Arabidopsis thaliana*. Son nom provient du mutant de sporulation chez la levure, isolé en 1969 et présentant une anomalie de la méiose (spores non viables) (202). Dans ces mutants nuls, nommés *spo11Δ* (délétion du gène), aucune CDB n'est détectée (203), entraînant une absence de recombinaison. Cette absence cause une ségrégation aléatoire des chromosomes lors de la méiose I et un contenu chromosomique anormal dans la majorité des spores. Chez les animaux et les champignons, un seul gène Spo11 est suffisant pour assurer la formation de CDB lors de la méiose. En revanche, toutes les plantes terrestres jusque-là séquencées présentent au moins 3 gènes Spo11 : Spo11-1 et -2 qui ont un rôle durant la méiose et Spo11-3 qui est impliqué dans le cycle cellulaire somatique. SPO11-1 et SPO11-2 sont essentiels pour la formation de CDB lors de la méiose (204, 205). Paradoxalement, SPO11-3, qui montre de loin la meilleure homologie de séquence avec la protéine TOPVIA des archées, est fonctionnelle et interagit avec TOPVIB chez les plantes. Le scénario le plus probable serait que Spo11-1 et Spo11-2 dérivent d'une duplication de Spo11-3 qui aurait eu lieu très tôt avant la séparation des animaux et des plantes et que les copies des gènes Spo11-2 et -3 auraient été perdues chez les animaux et les champignons mais conservées chez les plantes (Figure 17) (91, 206, 207).

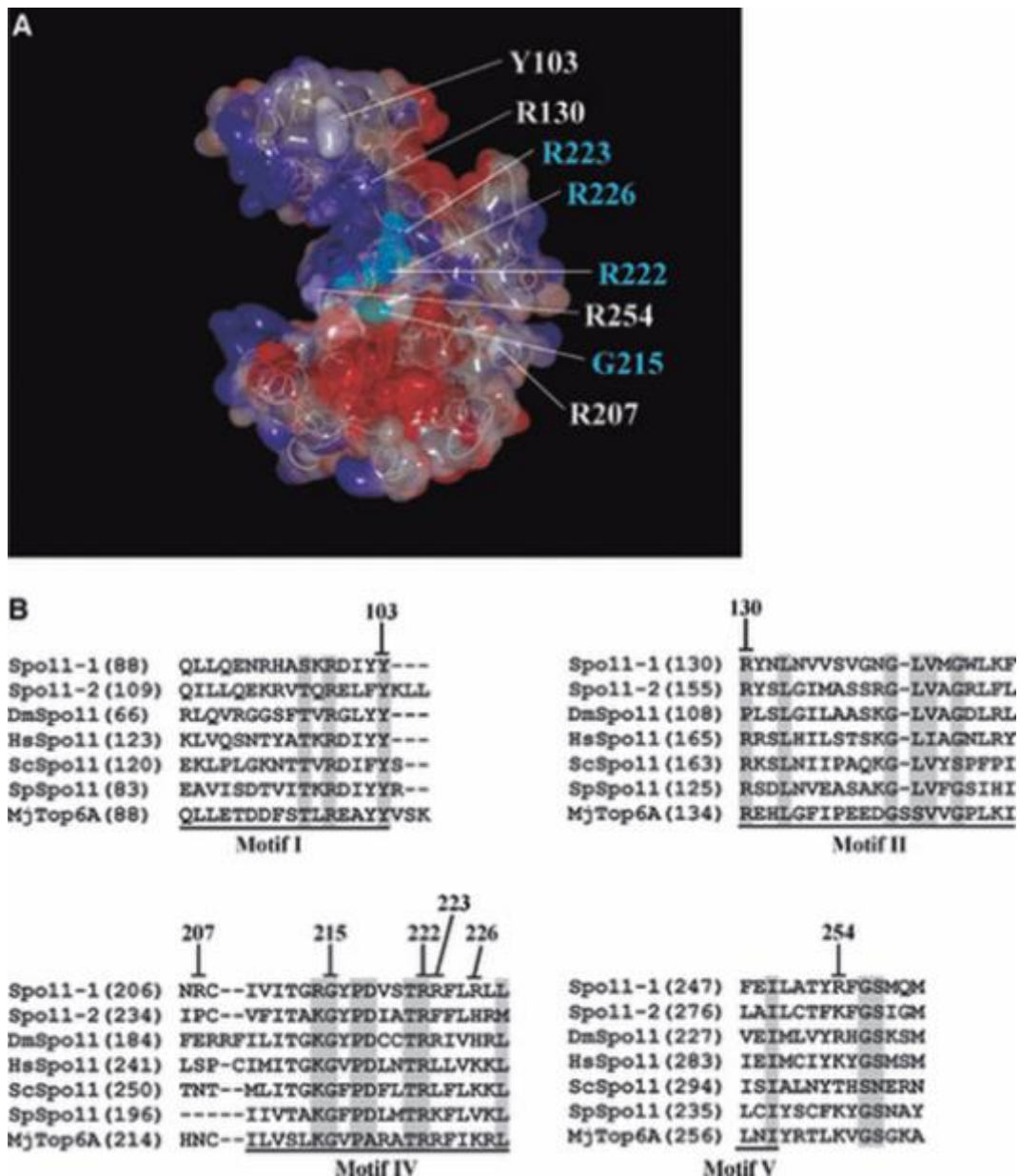


Figure 18 : Principaux sites catalytiques et de liaison à l'ADN de la protéine SPO11-1. (A) Un modèle 3D de SPO11-1 obtenu par modélisation par homologie. Ce modèle SPO11-1 comprend les résidus d'acides aminés 71 à 363. Les résidus Gly215, Arg222, Arg223 et Arg226 qui se sont avérés fonctionnels pour la liaison à l'ADN sont représentés en bleu clair. Les résidus Tyr103, Arg130, Arg207 et Arg254 qui ne sont pas impliqués dans la liaison à l'ADN sont indiqués en blanc. Le résidus Tyr103 est impliqué dans la catalyse des cassures double-brins. (B) Alignements des régions conservées entre différentes espèces. Les protéines SPO11-1 (numéro d'accèsion : AJ251989) et SPO11-2 (numéro d'accèsion : AJ251990) d'*Arabidopsis thaliana*, DmSpo11 de *Drosophila melanogaster* (mei-W68; numéro d'acquisition: AAC61735), HsSpo11 de *Homo sapiens* (numéro d'acquisition : AAD52562), ScSpo11 de *Saccharomyces cerevisiae*, SpSpo11 de *Schizosaccharomyces pombe* (rec12; numéro d'accèsion: CAB11511) et MjTop6A de *Methanococcus jannaschii* (numéro d'accèsion: AAB98358). Les acides aminés conservés chez au moins six des sept homologues sont ombrés en gris.

2.5.2 Organisation fonctionnelle et partenaires

Etrangement, Spo11-1 et Spo11-2 sont hautement conservées chez les plantes mais ne sont pas retrouvées sous la même forme chez les protistes et les algues vertes qui elles, auraient conservé les copies des gènes Spo11-3 et -2 (206). On observe par ailleurs une conservation ancestrale du contenu et de la localisation des introns dans les SPO11 d'animaux, de champignon et allant même jusqu'à 100% chez les plantes (206). L'orthologue de SPO11-1 d'*Arabidopsis thaliana* a une identité protéique allant de 95,5% avec celui d'*Arabidopsis lyrata* à 45,4% pour *Physcomitrella patens*. Il en est de même pour SPO11-2. Dans les deux cas, les monocotylédones montrent approximativement 10% d'identité protéique en moins par rapport à *Arabidopsis thaliana* en comparaison avec les dicotylédones, témoignant la très ancienne séparation entre ces deux branches. La structure conservée de Spo11-1 chez les plantes terrestres est formée de 15 exons et 14 introns. Spo11-2 est quant à lui formé de 11 exons et 10 introns.

Chez les plantes, SPO11-1 et SPO11-2 agissent en hétérodimère pour la formation des CDB par l'intermédiaire de divers sites de liaison à l'ADN et d'interactions protéine/protéine (205). La CDB serait catalysée par un résidu tyrosine présent chez ces deux protéines (208) (Figure 18). Chez le blé tendre nous retrouvons à la fois les trois protéines SPO11 (SPO11-1, 2 et 3) ainsi que la protéine MTOPVIB, ce qui suggère que le modèle ancestral pour la formation de CDB (SPO11-1 + SPO11-2 + MTOPVIB) serait aussi conservé chez cette espèce. L'intervention de cette autre protéine sous la forme d'un homodimère, MTOPVIB, ayant de fortes similitudes de structure 3D (mais non en composition en acides aminés) avec la protéine d'archées TOPOVIB, permet la formation d'un hétérotétramère qui serait responsable de la formation des CDB chez les plantes (209, 210) mais aussi chez les animaux (211) (Figure 19).

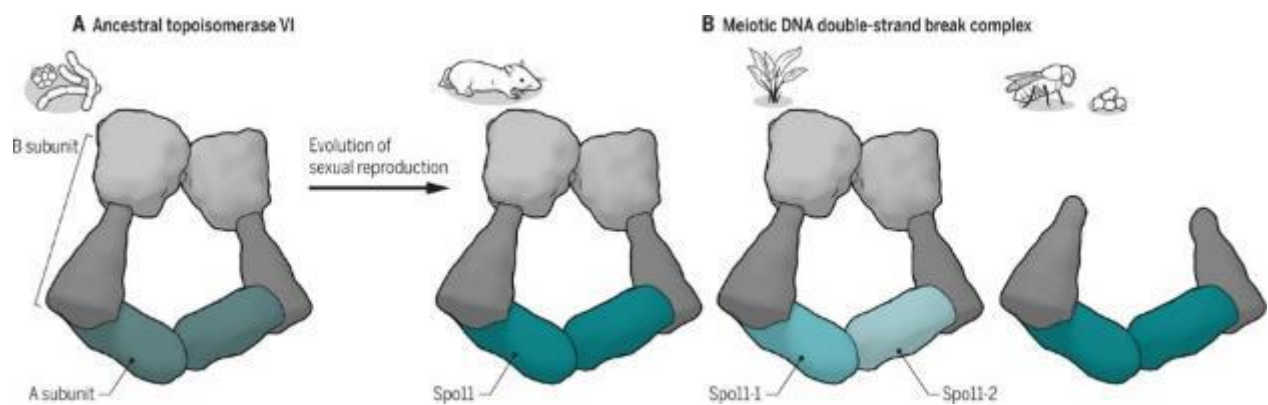


Figure 19 : De la topoisomérase à la machine de formation des cassures double-brins (CDB). (A) TopoVI utilise la liaison à l'ATP et l'hydrolyse par la sous-unité B pour coordonner le passage d'un duplex d'ADN à travers une CDB créé par les sous-unités A, modifiant ainsi la topologie de l'ADN. (B) Une TopoVI ancestrale a évolué en un complexe méiotique formant une CDB, qui possède différentes structures tertiaires et quaternaires dans différents organismes.

Le complexe SPO11 (SPO11-1, SPO11-2, MTOPVIB) est donc un complexe protéique élaboré et très conservé entre les espèces mais malgré cela il existe au sein de chaque espèce des spécificités pour le fonctionnement de ce complexe. Il est donc important de mieux connaître ces acteurs chez notre espèce d'intérêt, le blé tendre (*Triticum aestivum* L.).

Table 1 : Exemple d'espèces polyploïdes cultivées et leur classification en fonction de leur intérêt commercial, leur origine (synthétique/naturelle) et leur processus de formation (auto-allopolyploidisation).

Nom commun	Nom scientifique	Intérêt commercial	Origine	Formation	Niveau de ploïdie et nombre de chromosome
Avoine	<i>Avena sativa</i> L.	Grains	Naturelle	Allopolyploidie	6x = 42
Banane	<i>Musa acuminata</i> Colla	Fruits comestibles	Naturelle	Autopolyploidie	3x = 33
Blé dur	<i>Triticum turgidum</i> L.	Grains	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 28
Blé tendre	<i>Triticum aestivum</i> L.	Grains	Naturelle	Allopolyploidie	6x = 42
Cacahuète	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Noix	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 40
Caffé	<i>Coffea arabica</i> L.	Boisson	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 44
Canne à sucre	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Industriel	Naturelle	Allopolyploidie	8x = 80
Colza	<i>Brassica napus</i> L.	Huile et cuisine	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 38
Cotton	<i>Gossypium hirsutum</i> L. and <i>Gossypium barbadense</i> L.	Industriel	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 52
Fraise	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> (Weston) Duchesne ex Rozier	Fruits comestibles	Naturelle	Allopolyploidie	8x = 56
Hibiscus Pourpre	<i>Hibiscus acetosella</i> Welw. Ex Hiern	Ornementale	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 72
Igname	<i>Dioscorea alata</i> L.	Tubercules	Naturelle	Autopolyploidie	3x = 60; 4x = 80
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> Planch.	Fruits comestibles	Naturelle	Autopolyploidie	4x = 116
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> (A. Chev.) A. Chev.	Fruits comestibles	Naturelle	Autopolyploidie	6x = 174
Lime de Tahiti (citron vert)	<i>Citrus latifolia</i> (Yu. Tanaka) Tanaka	Fruits comestibles	Naturelle	Allopolyploidie	3x = 27
Luzerne	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>sativa</i> L.	Fourrage	Naturelle	Autopolyploidie	4x = 42
Moutarde chinoise	<i>Brassica juncea</i> L. Czern.	Huile et cuisine	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 36
Moutarde d'Abyssinie	<i>Brassica carinata</i> L.	Huile et cuisine	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 34
Patate douce	<i>Ipomea batatas</i> (L.) Lam.	Tubercules	Naturelle	Allopolyploidie	6x = 90
Poireau	<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Cuisine	Naturelle	Autopolyploidie	4x = 32
Pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Tubercules	Naturelle	Autopolyploidie	4x = 48
Prune	<i>Prunus domestica</i> L.	Fruits comestibles	Naturelle	Allopolyploidie	6x = 48
Tabac	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Industriel	Naturelle	Allopolyploidie	4x = 48
Betterave sucrière triploïde	<i>Beta vulgaris</i> L.	Industriel	Synthétique	Autopolyploidie	3x = 27
Camomille sauvage	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Médicinale	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 36
Lys	<i>Lilium</i> spp. L.	Ornementale	Synthétique	Autopolyploidie	3x = 36; 4x = 48
Magnolia de Kobé	<i>Magnolia kobus</i> "Norman Gould"	Ornementale	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 76
Manioc triploïde 'Sree Harsha'	<i>Manihot sculenta</i> "Sree Harsha"	Tubercules	Synthétique	Autopolyploidie	3x = 54
Muflier	<i>Antirrhinum majus</i> L. "Tetra Giant"	Ornementale	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 32
Œillets d'Inde triploïde	<i>Tagetes erecta</i> × <i>patula</i>	Ornementale	Synthétique	Allopolyploidie	3x = 18
Pastèque triploïde	<i>Citrullus vulgaris</i> Schard.	Fruits comestibles	Synthétique	Autopolyploidie	3x = 33
Ray-grass anglais tétraploïde	<i>Lolium perenne</i> L. "Grasslands Tama"	Fourrage	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 28
Ray-grass d'Italie tétraploïde	<i>Lolium multiflorum</i> L. "Grasslands Moata"	Fourrage	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 28
Rhododendron tétraploïde	<i>Rhododendron minus</i> "Epoch"	Ornementale	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 52
Seigle tétraploïde	<i>Secale cereale</i> L.	Grains/Fourrage	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 28
Trèfle des prés tétraploïde	<i>Trifolium pratense</i> L.	Fourrage	Synthétique	Autopolyploidie	4x = 28
Triticale	× <i>Triticosecale</i> Wittm.	Grains	Synthétique	Allopolyploidie	6x = 42; 8x = 56
Banane	<i>Musa</i> spp.	Fruits comestibles	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	3x = 33; 4x = 44
Chrysanthème	<i>Chrysanthemum</i> L.	Ornementale	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	4x = 36; 6x = 54; 8x = 72; 10x = 90
Pomme	<i>Malus</i> spp. Mill.	Fruits comestibles	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	3x = 51; 4x = 68
Raisin	<i>Vitis</i> spp. L.	Fruits comestibles	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	3x = 57; 4x = 76
Rose	<i>Rosa</i> L.	Ornementale	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	3x = 21; 4x = 28; 5x = 35; 6x = 42
Tulipe	<i>Tulipa</i> spp. L.	Ornementale	Synthétique/ naturelle	Autopolyploidie/ allopolyploidie	3x = 36; 4x = 48

2.6 La polyploïdie

2.6.1 Généralités

La polyploïdie est relativement fréquente chez les plantes. Néanmoins l'estimation de la proportion d'espèces polyploïdes est très variable dans la littérature, allant de 30 à 35% (212) à 70% (213) pour les angiospermes incluant une grande majorité des espèces cultivées comme le blé tendre, le colza, le coton ou encore la pomme de terre (Table 1) (214). Grâce à des analyses phylogénétiques d'EST (expressed sequence tags), Jiao *et al.* en 2011 (215) ont identifié deux évènements de duplication de génome entier (ou whole genome duplication, WGD) qui auraient eu lieu il y a 319 et 192 million d'années, juste après la diversification des plantes à graines et des plantes à fleur, respectivement. Par conséquent, il est admis que toutes les plantes à graines ont connu au moins un cycle de WGD dans leur histoire évolutive, caractérisant une ascendance paelopolyploïde (5). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer comment les polyploïdes apparaissent dans la nature. On sait que deux voies majeures conduisent à la polyploïdie chez les plantes: le doublement somatique du stock chromosomique et la formation de cellules reproductrices non réduites. Le doublage somatique est associé à des événements mitotiques tels que l'endomitose ou l'endoreduplication, pouvant survenir soit dans une cellule zygote, soit dans des tissus méristématiques apicaux, donnant naissance à des mixoploïdes ou même à des organismes complètement polyploïdes. Bien qu'il soit constamment utilisé pour obtenir des polyploïdes artificiels, le doublage somatique est supposé jouer un rôle mineur dans l'origine des organismes polyploïdes naturels (216). La production et la fusion de gamète non-réduits est la voie prédominante conduisant à la polyploïdie chez les plantes. La capacité à produire ces gamètes spéciaux est une caractéristique héréditaire mise en évidence chez de nombreuses espèces de plantes et qui est de ce fait contrôlé génétiquement. Cependant, des facteurs environnementaux tels

que la température, les herbivores, les blessures, le manque d'eau et de nutriments influencent la production de gamètes non réduits (216). Une fois formé, le gamète non réduit peut fusionner avec un autre gamète non réduit (polyploïdisation bilatérale) ou réduit (polyploïdisation unilatérale). D'un point de vue cytologique, au cours de la méiose, deux processus permettent la production de gamètes non réduits à partir de plantes diploïdes. Le premier processus (aussi appelé restitution de première division, FDR) implique une méiose I incomplète, lors de laquelle la séparation des chromosomes homologues n'a pas lieu. S'en suit une méiose II tout à fait normale, cependant deux cellules diploïdes sont formées au lieu de quatre cellules haploïdes. Le deuxième processus (appelé aussi restitution de deuxième division, SDR) implique quant à lui une méiose I normale suivie d'une méiose II défectueuse, qui aboutit également à deux cellules diploïdes au lieu de quatre cellules haploïdes. On considère souvent que la FDR produit des gamètes ayant un niveau d'hétérozygotie comparable aux parents (les deux chromatides étant non-sœurs), alors que la SDR produit plutôt des gamètes avec un niveau d'hétérozygotie inférieur à celui des parents tendant vers l'homozygotie (les chromatides étant sœurs) (217, 218).

Les épisodes de polyploïdie ont clairement joué un rôle majeur dans l'évolution et la spéciation des plantes. Les événements de polyploïdisation semblent souvent associés à une augmentation de la vigueur et à l'adaptation du polyploïde ainsi créé à de nouvelles conditions par l'apparition de phénotypes extrêmes (219). Grâce à des approches phylogénétiques, Fawcett *et al.* en 2009 (220) ont montré que de nombreuses lignées de plantes ont vécu indépendamment des WGD à l'époque de l'extinction du crétacé-tertiaire (extinction K-T). Ils ont également suggéré que la polyploïdie a favorisé certains changements (l'augmentation de la variabilité phénotypique, l'hétérosis, la tolérance aux mutations, la sous-fonctionnalisation suite à la duplication de gènes et les modifications des modes de reproduction) permettant aux individus polyploïdes de survivre aux modifications environnementales de cette époque et d'ainsi supplanter bon nombre de leurs

Autopolyploïdie versus Allopolyploïdie

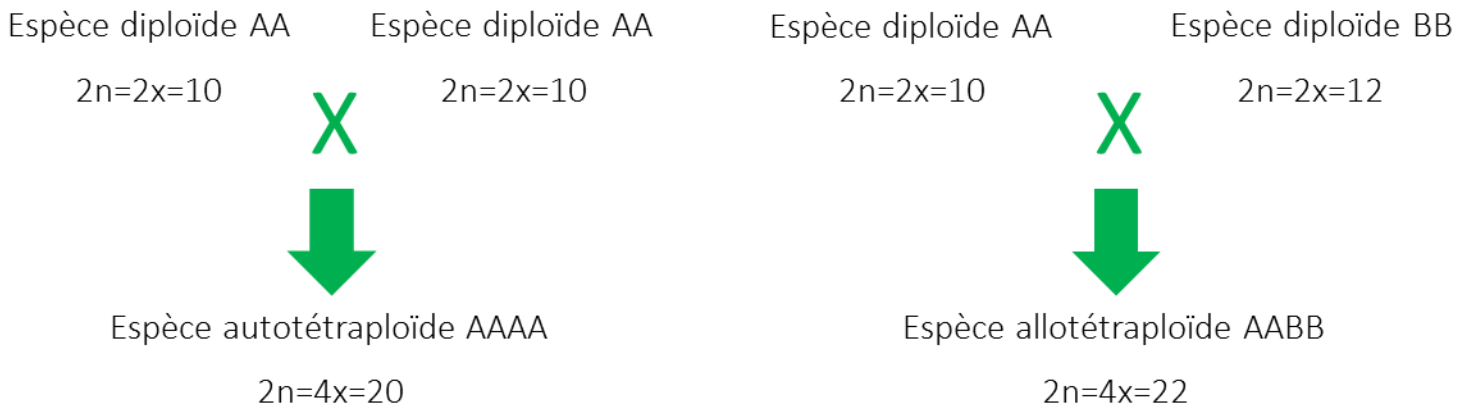


Figure 20 : Différence entre autopolyploïdie et allopolyploïdie. De façon générale, l'autopolyploïdie proviendrait d'une duplication du même génome et aurait une origine monophylétique. À l'inverse, l'allopolyploïdie viendrait de l'association de génomes d'espèces différentes et aurait donc une origine polyphylétique.

progéniteurs diploïdes. Les nouvelles caractéristiques résultant alors de ces changements suscitent aujourd'hui un grand intérêt dans l'optique du développement de polyploïdes synthétiques destinés à être intégrés dans des programmes de sélection variétale. La conséquence la plus répandue de la polyploïdie et l'augmentation de la taille des cellules due à l'augmentation du nombre de copies des gènes, cet effet est appelé effet « Gigas ». Bien que ce ne soit pas toujours le cas (212), les individus polyploïdes vont souvent arborer des organes plus grands comparés à leurs ascendants diploïdes, comme les racines, les feuilles, les fruits, les tubercules, les fleurs et les graines (221). Un individu polyploïde peut apparaître au sein d'une seule espèce (autopolyploïde), ou avoir une origine hybride (allopolyploïde) (221) (Figure 20). L'appartenance d'un individu à l'une ou à l'autre de ces deux classes est faite en analysant les profils d'appariement et d'héritage.

2.6.2 L'autopolyploïdie

Les autopolyploïdes résultent de l'association d'au moins 2 lots de chromosomes provenant d'une même espèce (Figure 20). Ils possèdent alors plus de deux copies de chaque chromosome. Par exemple les autotétraploïdes possèdent quatre copies de chaque chromosome (deux paires identiques de chromosomes homologues), on dit qu'ils sont à $4n$ chromosomes. Ils forment des bivalents aléatoires entre paires d'homologues, ainsi on observe des méioses diploïdes au sens cytologique mais pas au sens génétique (222). Dans la liste des autopolyploïdes couramment utilisés en agriculture, on trouve le bananier (*Musa acuminata*, autotriploïde, $3x=33$), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L., autotétraploïde, $4x=48$), ou encore le kiwi (*Actinidia chinensis*, autotétraploïde, $4x=116$) (Table 1).

2.6.3 L'allopolyplœdie

Les allopolyplœides ont pour origine une hybridation interspécifique (Figure 20) c'est-à-dire qu'ils ont pour chaque chromosome au moins deux paires diploïdes provenant de parents d'espèces différentes. Les allopolyplœides sont la plupart du temps considérés comme étant composés de deux sous-classes qui sont les allopolyplœides vrais et les allopolyplœides segmentaires. Les allopolyplœides vrais résultent de l'hybridation entre des espèces à l'apparement lointain. Dans ce cas, les chromosomes complémentaires provenant de chaque espèce ne se lient pas les uns aux autres, ce qui entraîne la formation d'univalents lors de la méiose et un modèle héréditaire désordonné. En ce qui concerne les allopolyplœides segmentaires, ceux-ci proviennent de l'hybridation d'espèces étroitement apparementées possédant des génomes partiellement différenciés (221). Par conséquent, les allopolyplœides segmentaires peuvent présenter la formation d'univalents, de bivalents et/ou de multivalents pendant la méiose. Ils sont ainsi considérés comme un type de polyplœides intermédiaires entre les vrais allopolyplœides et les autopolyplœides (223). Le colza (*Brassica napus* L., allotétraploïde, $4x=38$), le tabac (*Nicotiana tabacum* L., allotétraploïde, $4x=48$), le coton (*Gossypium hirsutum* L. et *Gossypium barbadense* L., allotétraploïde, $4x=52$) et le blé tendre (*Triticum aestivum* L., allohexaploïde, $6x=42$) font partie des allopolyplœides couramment utilisés en agriculture (Table 1).

2.6.4 Contraintes liées à la Polyplœdie

Bien que la polyplœdie soit répandue chez les plantes, elle oppose une difficulté supplémentaire aux chromosomes qui ont à leur disposition plus d'un partenaire auquel ils pourraient s'associer. En effet, à partir du moment où un chromosome ne se liera pas à son homologue, les gamètes

générés vont être déséquilibrés et la fertilité va être réduite (224). Néanmoins, la probabilité que cela se produise va être différente suivant le polyploïde concerné.

2.6.4.1 Autopolyploïdes

Chez les autopolyploïdes, tous les partenaires potentiels sont véritablement des homologues qui peuvent réellement recombiner entre eux et l'apparition de multivalents devient fréquente mais non systématique (225). Les chromosomes homologues forment des bivalents aléatoires résultant en méioses diploïdes au sens cytologique mais pas au sens génétique (222). Si l'on s'en tient à la théorie, une simple baisse de la formation de CO entrainerait une augmentation de la formation de bivalents et une amélioration de la ségrégation des chromosomes (29). Des travaux chez *Arabidopsis arenosa*, un autotétraploïde, ont montré que celui-ci forme moins de chiasma par bivalent que les diploïdes (226).

2.6.4.2 Allopolyploïdes

Chez les allopolyploïdes, la situation est plus complexe du fait que les chromosomes proviennent de parents diploïdes différents (on parle ici de chromosomes homéologues). Ils ne sont alors pas complètement complémentaires et interchangeables. La plante doit donc mettre en place un système pour pouvoir séparer les chromosomes homologues des homéologues pour que la ségrégation chromosomique se fasse correctement. Ce système est contrôlé génétiquement chez tous les allopolyploïdes (227), mais alors que leur rôle est absolument indispensable, les locus régulant la formation des CO entre homéologues restent encore mal connus. Seul le locus Ph1 du blé a été caractérisé au niveau moléculaire (voir chapitre 2.6.5.2). Ph2 est un autre locus bien caractérisé mais encore non identifié chez le blé (228, 229). Il altérerait la recombinaison entre homéologues dans les allopolyploïdes. Néanmoins Ph2 ne fonctionnerait pas de la même manière

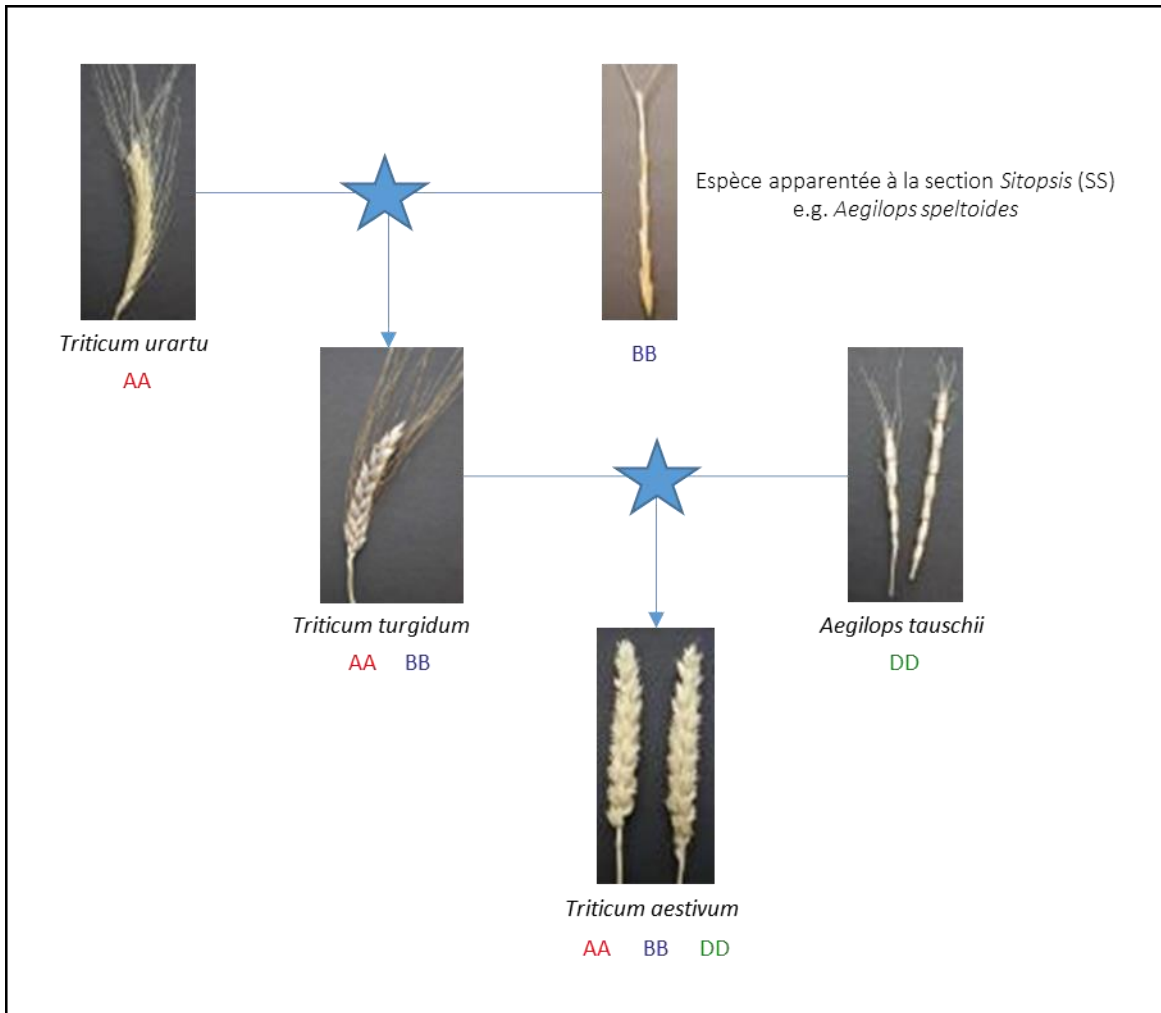


Figure 21 : Origine de blé tendre. Schéma représentant les deux évènements de polyploïdisation à l'origine du blé tendre *Triticum aestivum*. Ces évènements sont spécifiés par les étoiles bleues. La composition des génomes de chacune des espèces est spécifiée sous le nom d'espèce par les caractères A, B, ou D.

que Ph1 et en l'absence de Ph2, la synapse serait raccourcie et retardée alors que dans les mutant ph1 chez le blé, elle serait complète.

2.6.5 Cas du Blé tendre, espèce polyploïde modèle

2.6.5.1 *Historique*

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est un allo-hexaploïde dont le génome noté AABBDD est composé de trois sous-génomes diploïdes comportant sept chromosomes chacun ($2n = 6x = 42$) (Figure 21). Il descend de trois ancêtres différents qui ont divergé il y a 2,5-4,5 millions d'années. Deux de ces ancêtres, *Triticum urartu* (AA) et un membre de la section des *Sitopsis* (BB) se sont hybridés il y a 0,5 à 3 millions d'années. C'est le premier évènement de polyploïdisation créant *Triticum turgidum diccoïdes* (AABB). Cet ancêtre allotétraploïde va évoluer suite à sa domestication il y a environ 10-12 milles ans et donner *Triticum turgidum diccocom* (AABB). Enfin le deuxième et dernier évènement de polyploïdisation entre cet ancêtre AABB et *Aegilops tauschii* (DD) a eu lieu il y a 7000-9000 ans pour donner le blé tendre actuel, *Triticum aestivum* (AABBDD).

Ce génome allo-hexaploïde AABBDD de grande taille (environ 15 Gb, soit près de 5 fois la taille du génome humain et 160 fois celui d'*Arabidopsis*) est majoritairement constitué de séquences répétées (80%). Chacun des sous-génomes (A, B ou D) est composé de 7 chromosomes et, par exemple, les deux chromosomes 1A seront dit homologues alors que les chromosomes 1A, 1B et 1D seront dit homéologues. Ces particularités sont à l'origine du retard conséquent qu'accusent les études sur la structure de ce génome et notamment sur son profil de recombinaison.

2.6.5.2 *Recombinaison homéologue*

La particularité polyploïde du blé tendre pourrait poser la question de l'appariement entre homéologues de ces sept jeux de chromosomes ayant une similarité très forte. Cependant, force est de constater que le blé tendre se comporte comme une espèce diploïde en ce qui concerne la méiose, impliquant un contrôle supplémentaire de l'appariement entre homéologues. Dans les années 1950 (230), un locus appelé Ph1, pour Pairing homeologous 1, a été identifié comme permettant l'appariement correct des chromosomes homologues. Localisé sur le bras long du chromosome 5B (231), il est composé d'un groupe de gènes de type Cdk (proche des Cdk2 de mammifères, (232–234) rendus défectueux par l'insertion d'une copie d'un segment d'hétérochromatine provenant de la partie subtélomérique du chromosome 3B. Ce locus favoriserait une méiose de type diploïde par l'altération de la condensation de la chromatine en réduisant l'activité de protéines de type CDK2 (234). Il contient notamment une copie paralogue du gène TaZip4 nommé TaZip4-2B et présente en une seule copie et seulement sur le chromosome 5B. Des mutants pour ce seul gène au sein du locus Ph1 ont montré de hauts niveaux de CO homéologues lors de croisements avec des espèces apparentées sauvages (235). Ce locus est absent des espèces diploïdes apparentées, ce qui suggère que celui-ci est apparu après l'évènement de polyploïdisation (236). L'absence de Ph1 induit également une augmentation du nombre de sites MLH1 sous certaines conditions de culture (237). TaAsy1 est un autre gène dont l'activité est modifiée par l'absence du locus Ph1. Cependant, l'impact sur TaAsy1 n'est pas encore très clair. TaAsy1 pourrait être une cible du locus Ph1 comme il pourrait aussi simplement réagir en réponse à la charge méiotique laissée par l'absence de Ph1. D'autres portions chromosomiques jouent un rôle dans l'appariement entre chromosomes pour la recombinaison : le groupe d'homéologie 3. Plus précisément, un locus nommé Ph2 localisé sur le bras court du chromosome 3D (238–240). Les gènes de ce locus n'ont pas encore été identifiés mais Ph2 aurait une incidence sur la recombinaison chez les blés allohaploïdes (ABD),

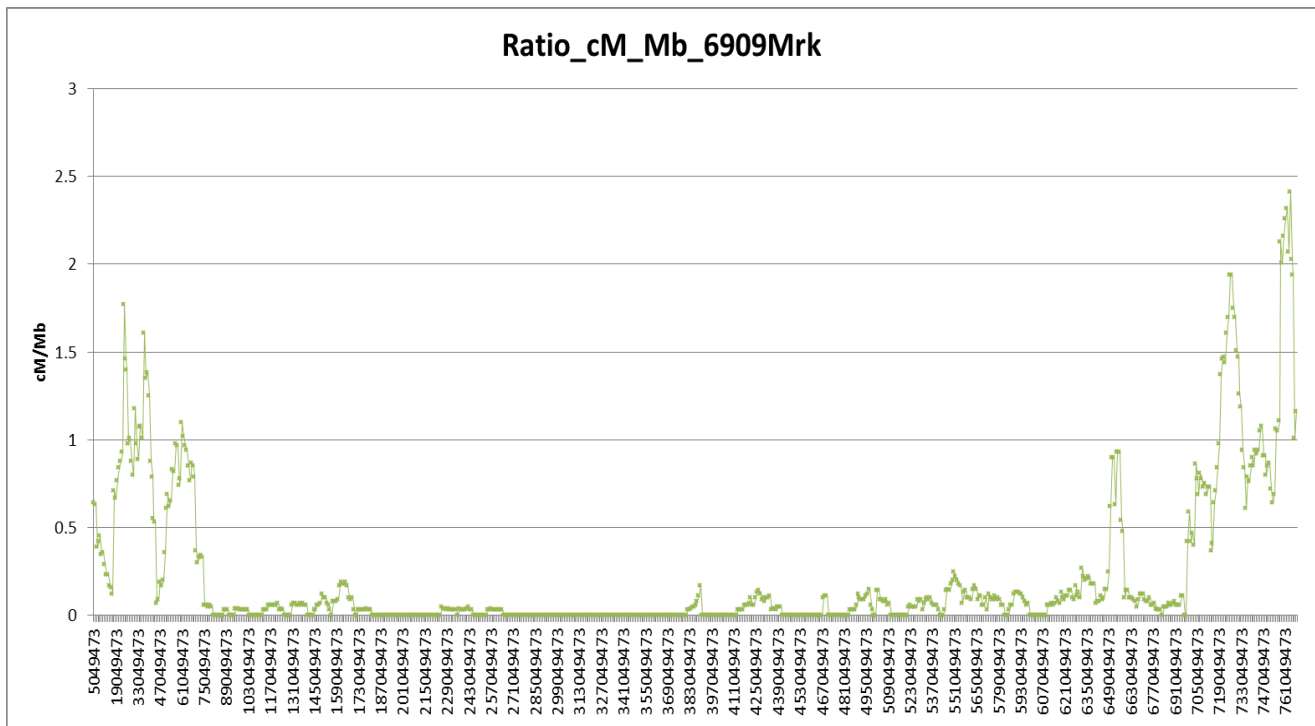


Figure 22 : Répartition des évènements de recombinaison le long du chromosome 3B de blé tendre. 6909 marqueurs ont été génotypés le long du chromosome 3B dans la descendance d'une population de croisement entre les variétés de blé tendre Chinese Spring et Renan, pour la recherche d'évènement de recombinaison. Le ratio en cM/Mb a été déterminé entre chaque marqueurs.

pentaploïdes (AABBD) et les hybrides haploïdes entre le blé et le seigle (ABDR) (238, 239). Un autre gène qui serait une copie homéologue de Ph2 porté par le bras court du chromosome 3A (240, 241), préviendrait aussi la recombinaison homéologue mais serait moins efficace que Ph2 (241). Le retrait des bras court des chromosomes 3A ou 3D dans des hybrides entre le blé et le seigle (240) montre un niveau d'appariement homéologue au moins équivalent à celui de plantes dans lesquelles Ph1 est absent.

2.6.5.3 *Recombinaison homologue*

Chez le blé tendre, la recombinaison est principalement localisée au niveau des télomères avec un modèle de répartition dit en U (Figure 22) (50, 53, 55). La première visualisation de la localisation préférentielle de la recombinaison dans les parties distales a été faite en 1993 avec la visualisation cytologique des chiasmas chez des lignées de blé dur dans les parties distales des chromosomes du groupe 3 (242). L'étude d'autres groupes d'homéologie relierait la recombinaison aux parties riches en gènes (48, 243, 244). La structure et le contenu de ces régions seraient un des facteurs permettant la recombinaison. En effet, en modifiant les chromosomes (délétions, translocations, retournement de bras chromosomique), les chiasmas, et donc la recombinaison méiotique, ont toujours lieu dans les mêmes régions (245).

La recombinaison chez le blé tendre a tout particulièrement été étudiée le long du chromosome 3B (50, 53, 55). Ces études ont permis de montrer que la recombinaison s'effectue à 90% dans les régions sub-télomériques distales. Ces régions ne représentent pourtant que 40% du chromosome. Des études supplémentaires utilisant 3075 marqueurs génétiques répartis sur le chromosome 3B (38,2+/-9,4 SNPs / 10MB) ont permis le génotypage de plus de 280 lignées recombinantes SSD (Single Seed Descent) entre la variété asiatique Chinese Spring et la variété européenne Renan, et 720 individus issus d'une collection provenant de ressources génétiques. Ce génotypage met en

évidence que la recombinaison a lieu dans seulement 13% du chromosome (53) avec un taux de recombinaison moyen le long du chromosome de 0,16 cM/Mb avec 3,6 CO en moyenne par paire de chromosomes homologues. Ce taux variable le long du chromosome 3B permet la segmentation de celui-ci en 3 parties : deux parties distales R1 et R3 et une partie centrale R2 contenant le centromère. Les taux de recombinaison sont de 0,60, 0,96 et 0,05 cM/Mb respectivement pour ces régions R1, R3 et R2 (53). De ces résultats découle alors l'identification de 22 régions avec un taux de recombinaison 10 fois supérieur à la moyenne du chromosome, pouvant être ainsi considérées comme des points chauds de recombinaison (53). L'étude d'un point chaud de recombinaison sur le chromosome 3B a permis de mettre en évidence que les CO ont tendance à avoir lieu près des gènes (52).

La localisation préférentielle des CO au niveau des télomères implique qu'une grande partie des gènes situés au milieu des bras et proches du centromère ont peu ou pas de chance d'être brassés génétiquement. On voit alors se mettre en place des liaisons négatives entre des gènes d'intérêt agronomique et des gènes considérés comme ayant des effets négatifs (sensibilité aux maladies, sensibilité à la sécheresse, etc.). Il devient alors indispensable de connaître et maîtriser la machinerie méiotique pour ainsi pouvoir améliorer le brassage génétique.

Des expériences immunologiques dont certaines ont été réalisées récemment sur le blé tendre (246) permettent d'avancer que le déroulement de la méiose chez le blé serait similaire à celle d'autres céréales à grand génome comme l'orge. Une structure particulière dite en guirlande de Noël (tinsel-like) a été observée chez l'orge et le blé tendre. De plus les acteurs de la méiose et de la recombinaison méiotique identifiés dans les espèces végétales modèles conserveraient leur rôle chez le blé tendre (247).

Les connaissances limitées de la mécanistique de la méiose chez cette espèce de grande culture opposent alors un frein indéniable à la maîtrise et à la modification de celle-ci. De nombreuses

questions restent alors en suspens et les études permettant de mieux comprendre la recombinaison méiotique chez le blé tendre permettront de franchir ces écueils pour mieux la contrôler

2.7 Objectifs de la thèse

Chez le blé tendre, l'essentiel des événements de recombinaison apparaît dans les parties distales des chromosomes pour décroître au niveau de la région péricentromérique. Ce profil est tout à fait particulier et il semble spécifique des espèces à grands chromosomes. L'obtention récente de la séquence complète du génome du blé tendre, annotée et ancrée sur les cartes génétiques a permis de progresser sur la distribution et l'intensité de la recombinaison et sur l'impact que cela peut avoir sur le brassage génétique qui en découle. En effet, la recombinaison est quasiment absente des parties péricentromériques portant près de 70% des gènes. Ce résultat suggère alors des difficultés à brasser correctement les gènes et les allèles et à trouver rapidement des combinaisons originales susceptibles d'améliorer l'efficacité de développement de nouvelles variétés répondant aux enjeux actuels d'une agriculture assez productive pour répondre aux besoins et respectueuse des contraintes environnementales. De nombreuses stratégies voient le jour pour mieux contrôler la recombinaison. Ainsi la recherche de mutants de gènes méiotiques semble être une stratégie intéressante pour augmenter la recombinaison mais à des endroits où celle-ci existe déjà. D'autres stratégies font intervenir la température et les marques épigénétiques mais posent la question de savoir comment cela va fonctionner chez le blé alors que son génome est majoritairement composé d'éléments transposables. Le ciblage de la recombinaison méiotique semble alors prometteur mais de nombreuses questions restent en suspens : Quelle technique de ciblage ? Quelle stratégie pour amener la recombinaison à un endroit donné ? Quelles caractéristiques de la séquence pour la cible ?

L'amélioration ciblée de la recombinaison dans certaines régions a déjà été expérimentée chez la levure (200). Afin de diriger la recombinaison méiotique dans des régions normalement faiblement recombinogènes, La protéine SPO11, catalysant les CDB initiatrices de la recombinaison

méiotique, a été fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN afin de cibler des régions précises du génome. Cette protéine de fusion augmente significativement (jusqu'à 20 fois) les CDB dans des régions normalement froides et cette augmentation est couplée avec un accroissement simultané de la recombinaison (jusqu'à 10 fois). Ainsi, le ciblage des CDB stimule la recombinaison le long des chromosomes. Leurs résultats montrent aussi que bien que la recombinaison soit stimulée au niveau des CDB ciblées, celle-ci est redistribuée le long du chromosome. Cette technologie portant le nom de Spix®, couverte par un brevet détenu par la société MeioGenix®, est donc intéressante afin d'évaluer s'il est possible de diriger la recombinaison méiotique chez le blé. En particulier, il s'agit d'étudier si le ciblage d'une région connue pour être faiblement recombino-gène améliore la recombinaison dans cette région et modifie le taux de recombinaison autour de cette zone et au niveau du chromosome entier.

L'objectif principal de mon travail de thèse est alors d'étudier les facteurs déterminants pour le ciblage de la recombinaison méiotique chez le blé tendre afin d'améliorer celle-ci. Afin d'y parvenir, il s'agit dans un premier temps de retrouver et d'annoter les séquences codant pour les protéines SPO11 chez le blé tendre afin de parvenir à une séquence fonctionnelle. Ensuite il s'agit d'exploiter la séquence complète du chromosome 3B de blé pour identifier des zones faiblement recombino-gènes et y-définir des zones cibles favorables pour initier une CDB dirigée, catalysée par la protéine SPO11. Des projets similaires ont été initiés chez le maïs et le riz dans d'autres laboratoires. Enfin, il s'agit aussi de déterminer quelle biotechnologie de ciblage à l'ADN est la plus fonctionnelle, polyvalente et efficace pour conduire la protéine SPO11 dans des régions choisies afin de catalyser les cassures double-brins initiatrices de la recombinaison méiotique.

Si les résultats s'avèrent concluants, il sera intéressant d'utiliser cette technologie pour casser des liaisons négatives chez le blé. De plus, ces avancées pourraient être transférables à d'autres espèces d'intérêt dans la mesure où le génome du blé présente des particularités uniques (taille, quantité de

séquences répétées, polyploïdie) qui en font l'un des modèles les plus complexes des espèces cultivées. Si cette stratégie est fonctionnelle sur blé, il est donc très vraisemblable qu'elle sera adaptable à toutes les espèces ayant un génome moins complexe.





MATERIELS ET METHODES

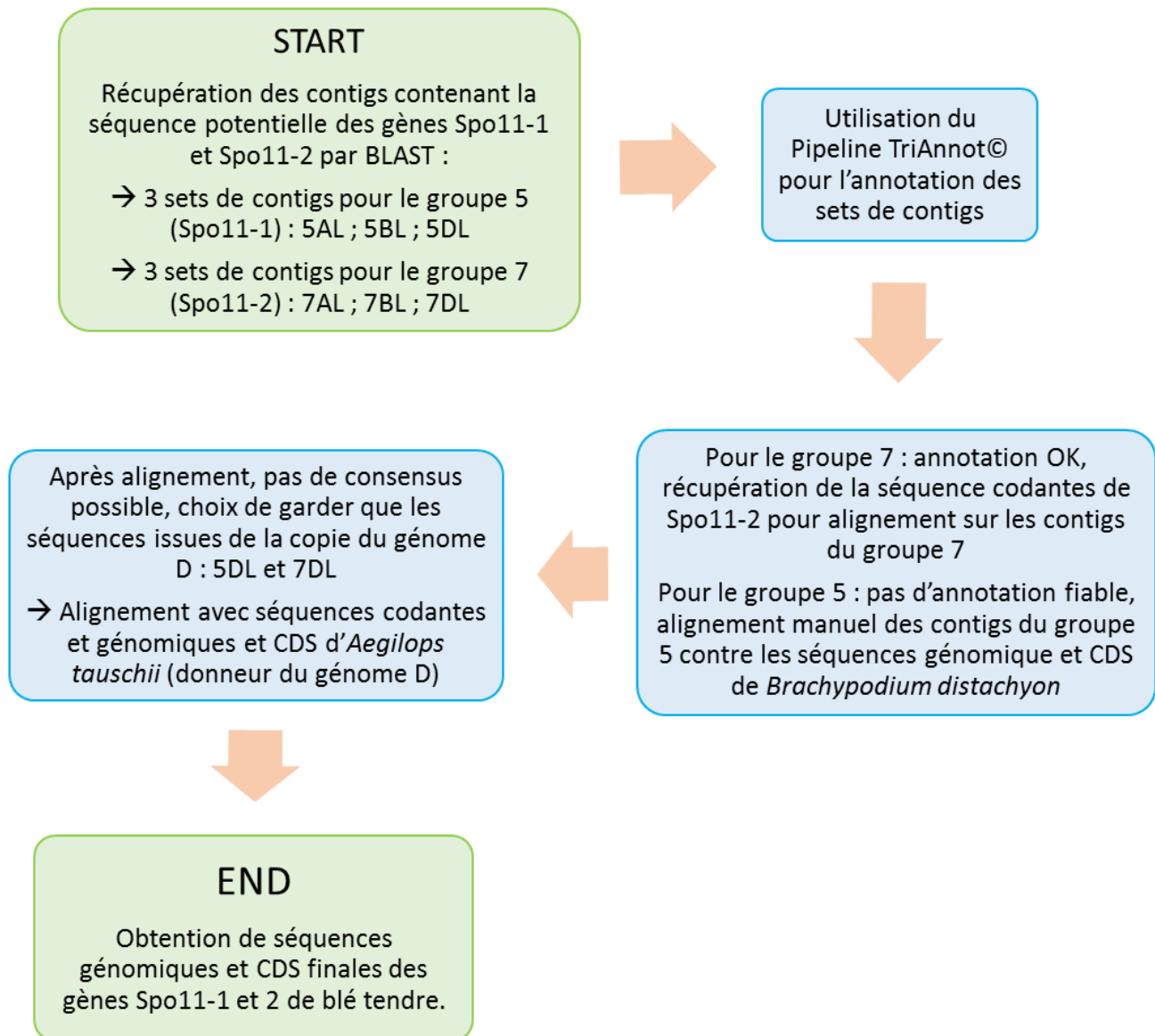


Figure 23 : Schéma de détermination des séquences génomiques et CDS des gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre. La séquence des gènes Spo11-1 et Spo11-2 d'*Arabidopsis thaliana* ont permis d'isoler 6 contigs dans la base de donnée des séquences du blé tendre. Chacun des contigs est soumis à la plateforme TriAnnot© et dans le cas d'un défaut d'annotation, la séquence est annotée à la main grâce à la séquence génomique de *Brachypodium distachyon*. Enfin la détermination des CDS est faite par alignement manuel avec les séquence d'*Aegilops tauschii* et *Brachypodium distachyon*.

3 MATERIELS ET METHODES

3.1 Découverte des orthologues de SPO11 chez le blé tendre et clonage

Les orthologues de Spo11-1 et Spo11-2 chez le blé sont isolés en utilisant comme séquence source les protéines d'*Arabidopsis thaliana* qui sont déjà bien identifiées et caractérisées (Figure 23). Pour ce faire nous avons effectué une recherche BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, 225) à partir des séquence *Arabidopsis* (Spo11-1 et Spo11-2) sur la base de données sur le génome du blé la plus fiable disponible au laboratoire lors du début des recherches (CSS, Chromosome Survey Sequencing, 226). Cette base de donnée est issue du séquençage de bras de chromosomes isolés. De cette manière chaque séquence est associé à un chromosome d'un des trois génomes homéologues. Partant du principe que les deux gènes possédaient chacun trois orthologues correspondant aux trois génomes du blé tendre, seul le premier résultat avec la plus forte e-value pour chaque génome a été conservé.

Une fois les séquences génomiques récupérées, la position des exons et des introns est déterminée afin de constituer la version codante de chaque gène. Pour cela, nous avons utilisé les deux gènes annotés chez *Brachypodium distachyon*, une poacée proche du blé tendre, avec la version génomique et CDS (c'est-à-dire les exons mis bout à bout dans l'ordre dans lequel ils sont présents dans la version génomique) de chaque gène ainsi que les deux gènes annotés chez *Aegilops tauschii*, l'ancêtre du génome D du blé tendre. Le génome de l'ancêtre du génome A, *Triticum urartu*, n'était pas d'assez bonne qualité pour être exploité et l'ancêtre direct du génome B n'est pas identifié et les génomes des espèces apparentées n'étaient pas disponibles.

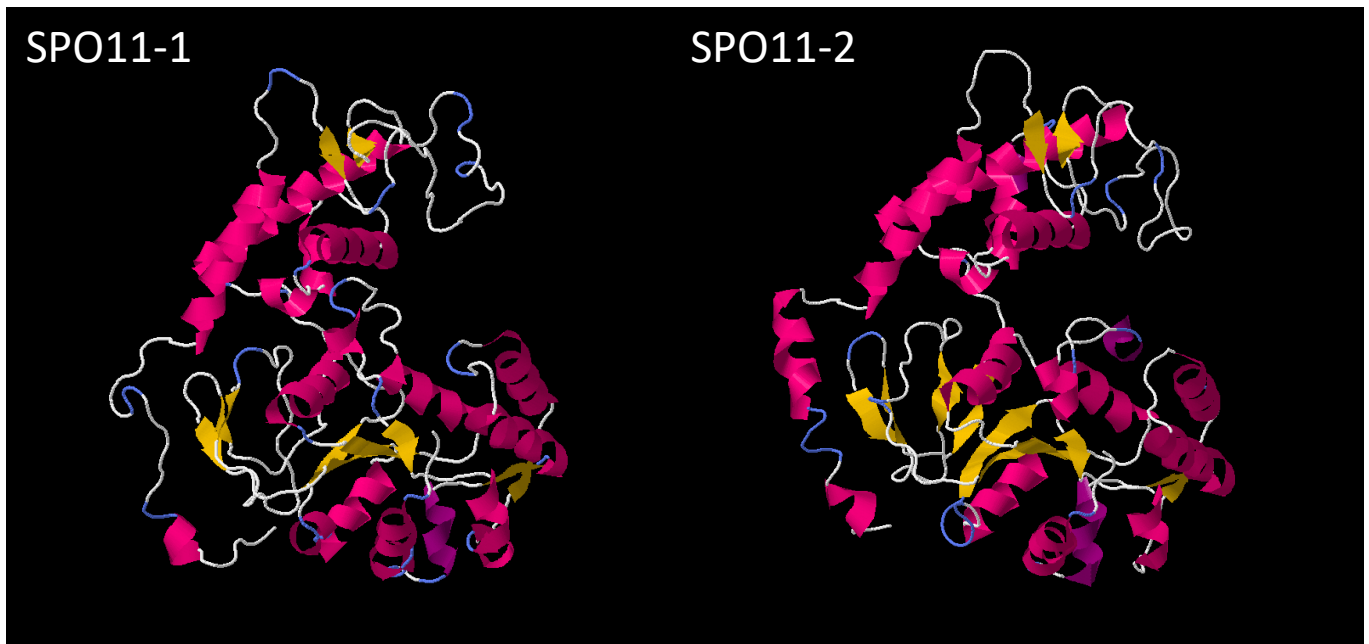


Figure 24 : Modélisation des protéines SPO11-1 et SPO11-2 par homologie de séquences grâce à l’outil en ligne PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Les séquences génomiques et CDS des deux références (*Brachypodium distachyon* et *Aegilops tauschii*) ont été alignées au niveau des parties exoniques afin de déterminer la limite de chaque intron. Les séquences génomiques du blé tendre ont ensuite été alignées sur cet alignement de séquences de référence pour déterminer les limites des introns et des exons. A chaque intron, une vérification des signaux théorique d'épissage (AG-GT) a été effectuée pour valider l'intron (et par extension, l'exon). En plus de l'alignement des séquences génomiques de Spo11-1 et Spo11-2 par rapport à des séquences de référence, chaque portion génomique est soumise à la plateforme en ligne Triannot (<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/TriAnnot-pipeline>) qui a pour but de déterminer la présence d'un gène au sein d'une séquence et sa partie codante grâce à des bases de données protéiques et transcriptomiques.

Par la suite, le génome annoté du blé tendre a été rendu disponible au sein du laboratoire et la séquence génomique et codante des trois copies homéologues de Spo11-1 et Spo11-2 a été recherchée une nouvelle fois par BLAST puis annotée selon le même processus. Les CDS des gènes de blé ainsi déterminés ont été traduits en protéines grâce au logiciel en ligne ExPASy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) avec les paramètres par défaut. Une modélisation des deux protéines a été faite grâce à la plateforme Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Figure 24).

Compte-tenu de la forte similarité de séquence entre celle de blé et celle d'*Ae tauschii*, ancêtre du génome D, nous avons choisi de synthétiser la version ADNc du gène Spo11-1 portée par le génome D. Celle-ci a été synthétisée avec une courte séquence supplémentaire du côté 5' du gène (codant pour le peptide PEFMAMEAPGIR), servant de linker/spacer (ou lien/espaceur) dans la construction future de protéines de fusion (pour ainsi vérifier si celui-ci n'interfère pas dans la fonction de protéine), et flanquée des sites attB de recombinaison de la technologie de clonage Gateway™. Le produit synthétisé a été inséré dans un pDONR221 portant une résistance

antibiotique à la Zeocin™ et a ensuite été vérifié par séquençage. Le fragment complet a ensuite été cloné dans le vecteur Gateway™ de destination pMDC132 (250) dans lequel le promoteur 35S a été remplacé par le promoteur du gène Rad51 d'*Arabidopsis* (1031 pb en amont de l'ATG du gène Rad51) (117, 251) par une digestion HindIII/AscI. Le plasmide a ensuite été inséré dans une souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* qui a ensuite été utilisée pour transformer des plantes mutantes hétérozygotes *spo11-1-2* par la méthode du trempage floral (Floral dip, 228). Les graines T1 des plantes transformées par *Agrobacterium* ont été semées sur du substrat de culture et les transformants T1 ont été sélectionnés pour leur résistance à l'hygromycine sur milieu gélosé solide (0,5X MS/1% de saccharose / 0,8% agar) contenant 15 µg/ml d'Hygromycine B Gold (InvivoGen). La présence du transgène et les génotypes des transformants ont été vérifiés par PCR.

3.2 Complémentation d'un mutant d'*Arabidopsis* par le gène orthologue chez le blé tendre

3.2.1 Matériel végétal et conditions de culture

Le mutant d'*Arabidopsis thaliana spo11-1-2* (AT3G13170) utilisé dans ce travail a été décrit précédemment (204). Les plantes d'*Arabidopsis* ont été cultivées dans les conditions standard suivantes : les graines ont été stratifiées dans de l'eau à 4 ° C pendant 2 jours et cultivées sur substrat ou *in vitro* dans des boîtes d'agar à 0,8%, additionnées de 1% de saccharose et de sels Murashige et Skoog (à moitié de leur concentration usuelle, M0255; Duchefa Biochemie). Les plantes ont été cultivées dans une serre ou une chambre de croissance avec un cycle lumière / obscurité de 16/8 heures, à 23 ° C et à une humidité relative de 60%.

Table 2 : listes des espèces dont les séquences des protéines SPO11-1 ou SPO11 ont été utilisées pour la construction d'un arbre phylogénétique

Espèces	Protéine	Règne	Embranchement	Classe	Ordre	Accession NCBI	Accession Uniprot
<i>Triticum aestivum</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	-	A0A3B6KM14/ A0A3B6LTD1/ A0A3B6MY04
<i>Triticum urartu</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	-	M7YTX6
<i>Aegilops tauschii</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_020158624.1	M8BE82
<i>Sorghum bicolor</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_002466440.1	C5X098
<i>Zea mays</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_008643453.1	A0A1D6GGY0
<i>Setaria italica</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_004981745.1	K4AB74
<i>Brachypodium distachyon</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_003559449.1	A0A2K2DIL6
<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	XP_015630524.1	Q7Y021
<i>Oryza sativa ssp. Indica</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Monocotylédones	Poales	-	Q5ZPV8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Dicotylédones	Brassicales	NP_187923.1	Q9M4A2/ A0A178VGV5
<i>Brassica campestris</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Dicotylédones	Brassicales	AHY99546.1	A0A024AGF2
<i>Populus trichocarpa</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Dicotylédones	Malpighiales	XP_002300376.1	B9GFL2
<i>Medicago truncatula</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Dicotylédones	Fabales	XP_003617751.3	G7K4J4
<i>Solanum lycopersicum</i>	SPO11-1	Plantes	Magnoliophytes	Dicotylédones	Solanales	XP_010324272.1	-
<i>Physcomitrella patens</i>	SPO11-1	Plantes	Bryophytes	Bryopsidées	Funariales	XP_024377836.1	A0A024AGV9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SPO11	Champignons	Ascomycètes	Saccharomycètes	Saccharomycetales	NP_011841.1	P23179
<i>Caenorhabditis elegans</i>	SPO11	Animaux	Nematodes	Chromadorés	Rhabditida	NP_502081.1	Q22236
<i>Drosophila melanogaster</i>	SPO11	Animaux	Arthropodes	Insectes	Diptères	NP_995901.1	Q7KPA5
<i>Mus musculus</i>	SPO11	Animaux	Chordés	Mammifères	Rongeurs	NP_036176.1	Q9WTK8
<i>Homo sapiens</i>	SPO11	Animaux	Chordés	Mammifères	Primates	NP_036576.1	Q9Y5K1

3.2.2 Obtention de séquences des protéines SPO11-1 multi-espèces et phylogénie

Nous avons utilisé Ensembl Plant (253) et Ensembl (254) comme source pour les séquences des protéines SPO11-1 de plantes et SPO11 d'animaux. Nous avons également utilisé Plaza 4.0 (255) comme source pour les séquences protéiques de SPO11-1 de plantes. Les séquences des protéines SPO11 et SPO11-1 utilisées dans cette étude sont énumérées dans la Table 2. La phylogénie a été réalisée à l'aide de la plateforme Phylogeny.fr (256, 257) avec les paramètres suivants: Alignement ClustalW avec la curation de Gblocks et l'algorithme Maximum Likelihood (PhyML) pour la construction de l'arbre.

3.2.3 Étalements de chromosomes méiotiques mâles

Les étalements chromosomiques ont été préparés selon le protocole décrit par Ross *et al.* en 1996 (258). En bref, des inflorescences entières ont été fixées dans une solution d'éthanol et acide acétique glacial (3: 1) pendant 3 x 30 min et conservées à -20 ° C jusqu'à utilisation ultérieure. Les boutons floraux immatures ont été rincés deux fois à température ambiante dans de l'eau distillée pendant 5 min, suivi de deux lavages dans du tampon citrate 1X pendant 5 min. Des bourgeons de taille appropriée ont été sélectionnés sous loupe binoculaire et incubés pendant 75 à 90 minutes sur une lame dans 100 µL de mélange d'enzymes (0,3% p/v de cellulase (Sigma), 0,3% p/v de pectolyase (Sigma) et 0,3% de cytohélécasse (Sigma)) dans une enceinte humide à 37 ° C. Chaque bouton a ensuite été ramolli pendant 1 minute à 45 ° C dans 15 µL d'acide acétique à 60% sur lame, fixé avec une solution d'éthanol glacé/acide acétique glacial (3:1) et séché à l'air. Finalement, les lames ont été montées dans une solution de montage Vectashield avec DAPI (1,5 µg.mL⁻¹; Vector Laboratories Inc., <http://www.Vectorlabs.com/>).

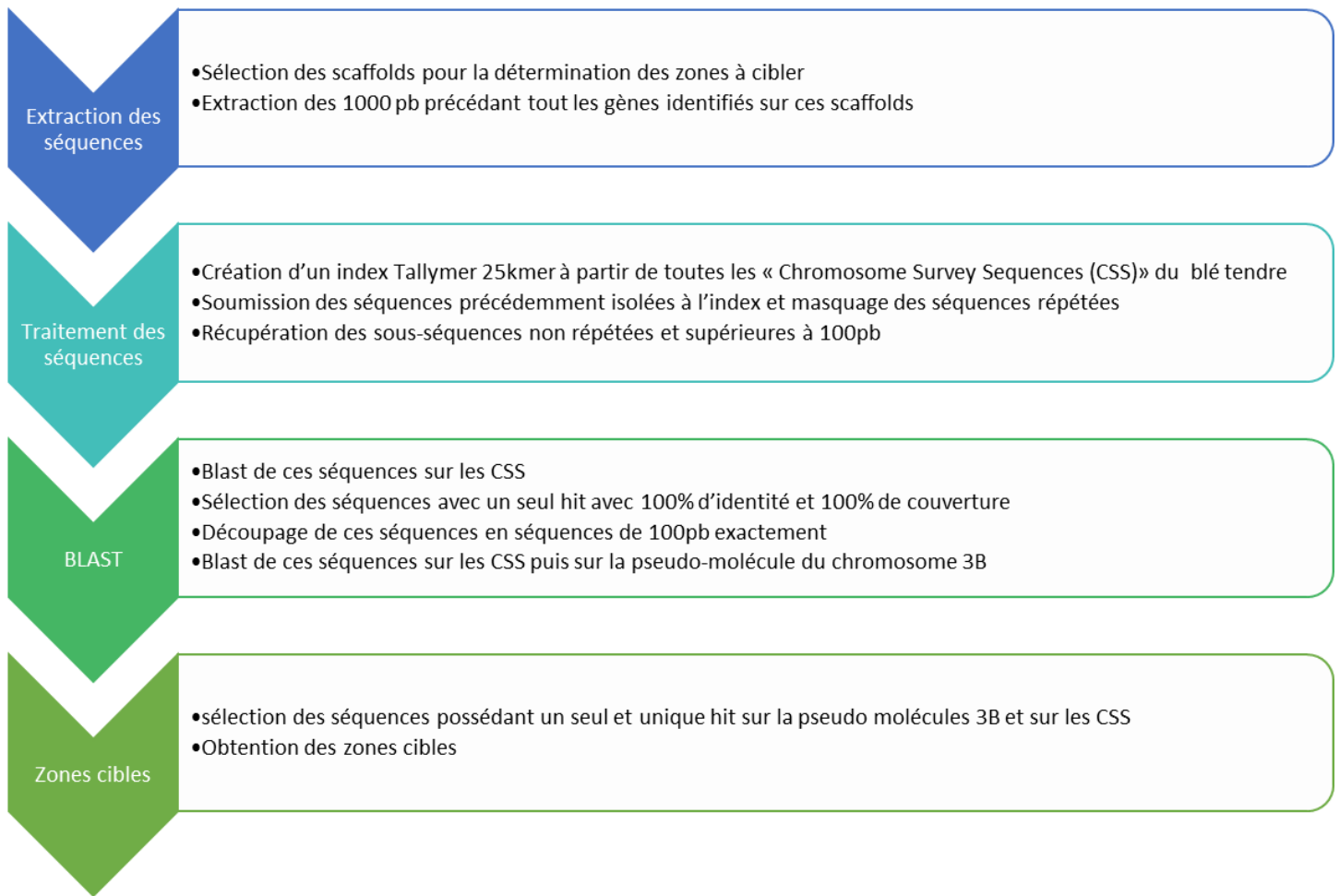


Figure 25 : Schéma représentant les étapes de définition des zones cibles sur le chromosomes 3B de blé tendre.

3.2.4 Microscopie

Toutes les observations ont été effectuées avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager.Z1 motorisé (Zeiss) avec un objectif à huile PL Apochromat 100X/1.40. Les photographies ont été prises avec une caméra AxioCam MRm (Zeiss) pilotée par le logiciel ZEN Pro (Zeiss). Les images capturées ont ensuite été traitées et ajustées pour la luminosité et le contraste avec les logiciels ZEN Pro et ImageJ FIJI.

3.2.5 Analyses statistiques

Tous les graphiques et analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad PRISM 6. Pour déterminer si les différences entre deux groupes étaient statistiquement significatives, les groupes ont été comparés à l'aide d'un test classique ANOVA à un facteur et d'un test de Holm-Sidak afin de prendre en compte les comparaisons multiples. Une P-value inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

3.3 Recherche de cibles pour la technologie SpiX le long du chromosome 3B

3.3.1 Définition des zones cibles sur le chromosomes 3B

3.3.1.1 *Zones non recombinantes*

L'identification des zones cibles a nécessité l'analyse approfondie de la séquence du chromosome 3B (Figure 25) dont le taux de recombinaison méiotique a été initialement déterminé sur des séquences dites scaffolds résultants de l'assemblage de lectures de séquençage mais ne couvrant que de petites portions du chromosome (quelques mégabases). Nous nous sommes servis du

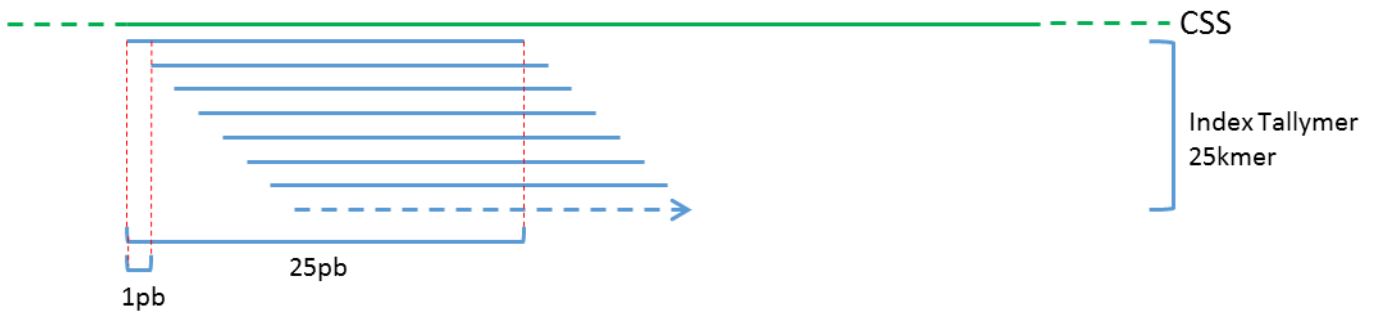


Figure 26 : représentation schématique de la création d'un index Tallymer 25kmer.

résultat de cette cartographie pour déterminer les 439 scaffolds ayant un taux de recombinaison égal à zéro. Les données de la littérature indiquent que la recombinaison a préférentiellement lieu dans les parties 5' des gènes (39). Nous avons donc choisi d'extraire *in silico* les 1000 paires de bases précédant chacun des 2820 gènes présents dans ce set de scaffolds non-recombinants pour en faire le jeu de séquences de base pour la recherche de zones cibles pour la technologie SpiX. Ce sont alors 2820 séquences correspondant aux régions promotrices des gènes qui constituent la base de données de départ pour la recherche de zones cibles.

Le génome du blé présente une haute fréquence de séquence répétées ou éléments transposables, et afin d'éliminer ces séquences répétées du set de 2820 séquences, celle-ci ont été soumises à un index Tallymer 25kmer (259) réalisé à partir des Chromosomes Survey Sequences (CSS) disponibles pour le blé tendre (249) (Figure 26). Cet index est réalisé en extrayant des séquences de 25 paires de bases avec une fenêtre glissante de 1 paires de bases à partir des CSS. Cette étape a pour action d'identifier et d'éliminer les séquences répétées au sein du set de 2820 séquences. Pour ce faire, les séquences de 25 paires de bases sont alignées sur les 2820 séquences de notre set d'intérêt. Les régions correspondant à une même séquence de 25 paires de bases sont alors masquées pour pouvoir être éliminées. L'étape de masquage a pour effet de subdiviser chaque séquence de 1000 paires de bases en une multitude de séquences faisant parfois quelques paires de bases. Pour que l'on puisse correctement par la suite dessiner des cibles TAL ou CRISPR au sein de ces séquences, une fois ce processus terminé, seules les séquences non masquées et supérieures à 100 paires de bases sont conservées, ce qui représente un total de 6395 séquences. Afin de s'assurer de l'unicité de chacune de ces séquences, elles ont été soumises à des BLAST (248) à la fois sur les CSS et sur la séquence du chromosome 3B (53), afin de ne sélectionner que celles ne possédant qu'une seule homologie unique dans les deux cas. A la fin de ce crible, seules 25 séquences ont été conservées. Autant que cela a été possible, ces séquences ont été subdivisées en

séquences de 100 paires de bases environ et soumises une nouvelle fois à des BLAST sur les deux bases de données citées ci-avant. Au final, ce sont 19 séquences uniques de 100pb qui ont été retenues afin de servir de set de départ pour le dessin de cible TAL ou CRISPR pour le système SpiX dans des régions non recombinantes.

3.3.1.2 *Zones recombinantes*

Le même protocole que précédemment a été employé (Figure 25), à ceci près que le set de scaffolds de départ était cette fois-ci des scaffolds présentant un taux de recombinaison avoisinant la moyenne de recombinaison sur le chromosome 3B, à savoir 0.21 cM/Mb. Nous avons retenu 27 scaffolds de départ sur lesquels nous avons identifié les gènes et extrait in silico les 261 séquences dites promotrices de 1000 paires de bases. Etant donné le faible nombre de séquences par rapport au précédent jeu de données, nous avons préféré diviser chaque séquence de 1000 paires de bases en séquences de 100 paires. Ceci nous a permis de générer 2610 séquences à partir des 261 séquences promotrices sans perdre d'information. Elles ont été soumises au même processus que le jeu de données précédent afin de masquer les séquences répétées et de ne sélectionner que les séquences de 100 paires de bases n'ayant pas subi de masquage. Un total de 652 séquences a alors été soumis à un BLAST contre les CSS et la séquence du chromosome 3B et 23 ont présenté une seule homologie de séquence et ont été sélectionnées pour le dessin de cible TAL ou CRISPR pour le système SpiX dans des régions faiblement recombinantes.

A partir de ces deux jeux de données, des cibles ont été dessinées en respectant les spécifications propres à chaque domaine de liaison à l'ADN désiré. Pour faciliter l'analyse de la recombinaison et pour garantir au mieux la réussite du projet, le nombre de cible à dessiner en région non-recombinante comme en région faiblement recombinante a été arrêté à trois, pour un total de 6

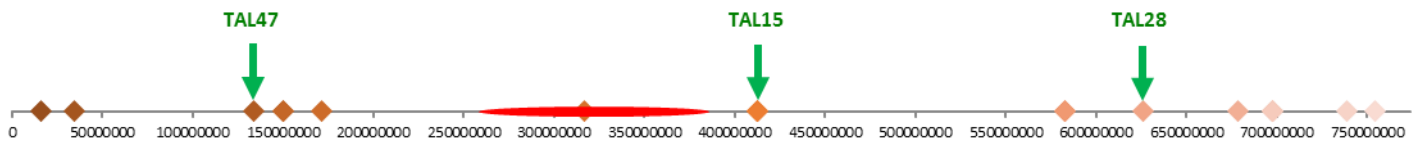


Figure 27 : Répartition des cibles TAL le long du chromosome 3B de blé tendre. L'axe des abscisses représente le chromosome 3B. Les cibles potentielles sont matérialisées par des losanges. Les cibles TAL choisies pour le ciblage TAL sont indiquées par une flèche verte. Le centromère est modélisé en rouge.

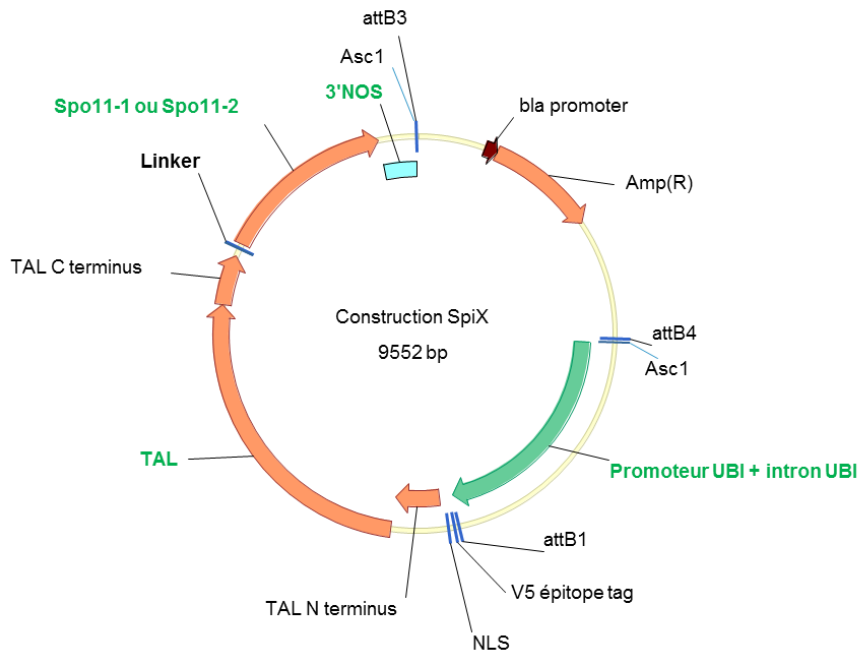


Figure 28 : Vecteur la séquence codante du TAL (TAL N terminus, TAL et TAL C terminus) juste après laquelle a été inséré la séquence CDS du gène Spo11-1 ou Spo11-2 en conservant ou non les deux premiers introns, sous le contrôle du promoteur UBI. Les séquences TAL et Spo11-1 ou Spo11-2 sont séparés par un linker permettant de rendre indépendante les deux protéines une fois fusionnées. Asc1 : site enzymatique de linéarisation du vecteur pour utilisation en biolistique. attB3 et attB4 : bornes de recombinaison Gateway. Bla promoteur et Amp(R) : gène de résistance bactérien. 3'NOS : terminateur de la Nopaline synthase. NLS : signal d'adressage au noyau. V5 epitope tag : marqueur protéique reconnu par des anticorps commerciaux.

régions distinctes ciblées pour l'amélioration de la recombinaison méiotique grâce au système SpiX.

3.3.2 Définition des cibles au sein des zones déterminées sur le chromosomes 3B pour les différentes technologies de liaison à l'ADN (TAL et CRISPR)

3.3.2.1 Cibles TAL

La première technologie de liaison à l'ADN retenue est celle des TALEN. Les cibles doivent respecter des critères stricts afin de pouvoir être pris en compte pour la construction de la séquence nucléotidique codante pour la protéine TALEN : la séquence de la cible doit faire 25pb, commencer par un T et contenir plus de 50% de GC. C'est donc avec les spécifications propres aux TALEN que nous avons dessiné trois cibles à partir du set de séquence unique dans des régions non recombinantes dans un premier temps. Ces trois cibles ont été nommées 15-412, 28-626 et 47-133 et ont été choisies afin d'être réparties uniformément sur le chromosome 3B de blé tendre (Figure 27). Ainsi la cible 15-412 se trouve en 5' du centromère, la cible 47-133 au milieu du bras court et la cible 28-626 au milieu du bras long. Seule la cible 28-626 est située dans une région froide encadré par des régions chaudes alors que les deux autres sont situées dans des portions du chromosome éloignées de toute région chaude. Trois vecteurs contenant la séquence codant pour les trois protéines TALEN ont donc été commandés à la société GeneArt® sans la partie endonucléase (EN) qui sera remplacée par les protéines SPO11-1 et SPO11-2 et placée sous le contrôle du promoteur UBI de maïs (Figure 28). Le domaine de liaison est donc nommé TAL. Ces gènes ont une longueur de 3375 paires de bases et donnent une protéine de 1125 aa. Ces protéines TAL correspondant aux cibles 15-412, 28-626 et 47-133 sont ainsi nommées respectivement TAL15, TAL28 et TAL47. Ces protéines TAL sont composées de trois parties : une partie N-



Figure 29 : Schéma de la protéine TAL. La protéine TAL est composée de 3 parties, deux fixes (N-terminale et C-terminale) et une comportant la spécificité de la protéine TAL à la cible. Ici chaque brique de couleur dans la partie centrale a une spécificité pour une des quatre bases de l'ADN.

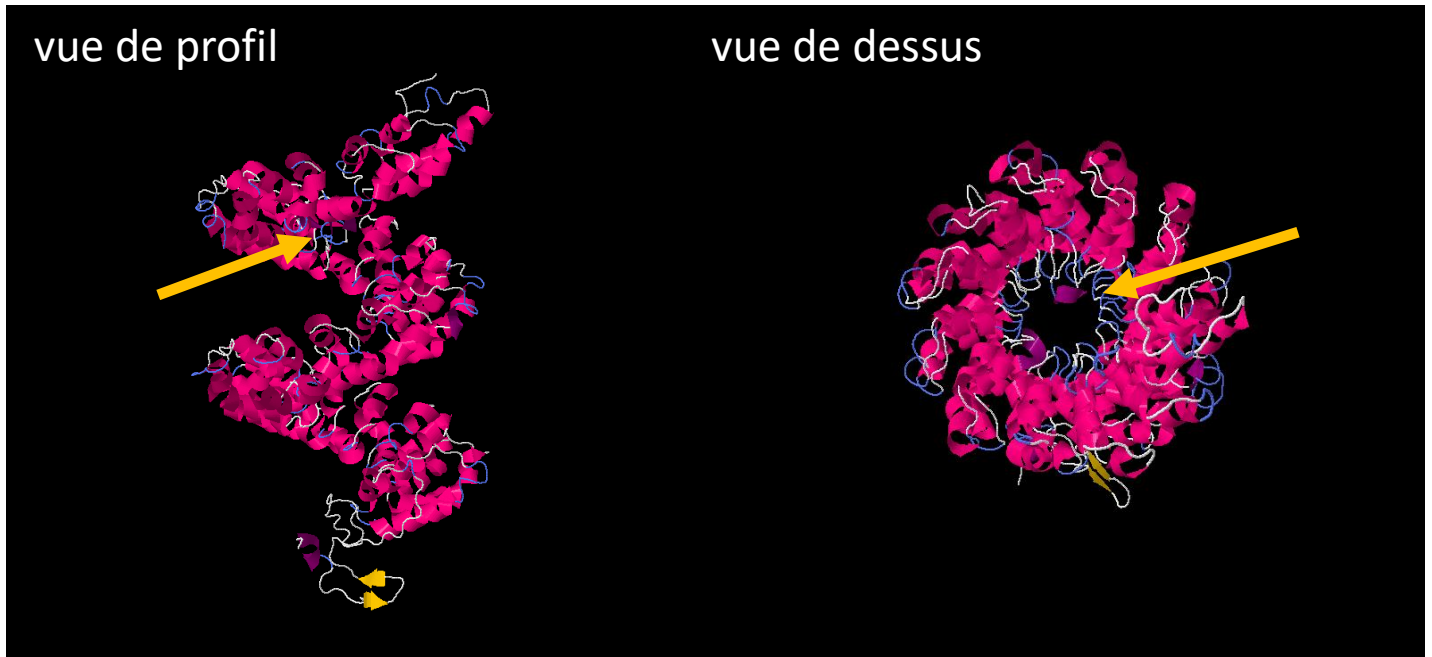


Figure 30 : Modélisation de la protéine TAL par homologie de séquences grâce à l'outil en ligne PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). La flèche jaune indique que les acides aminés 12 et 13 de chaque section de la partie spécifique du TAL sont orientés vers l'intérieur afin d'entrer en contact avec la double hélice de l'ADN.

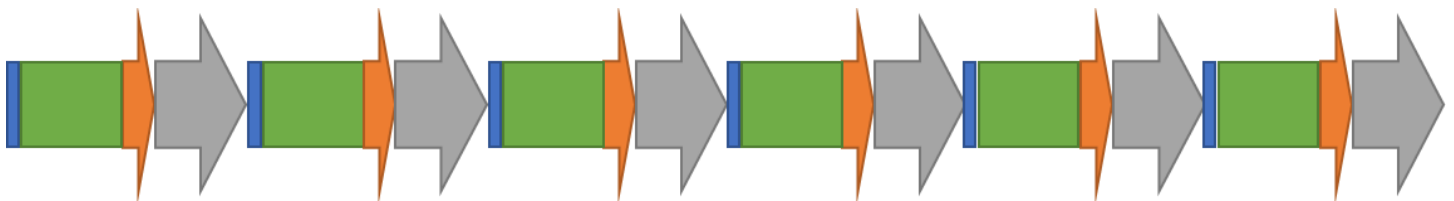


Figure 31 : Schématisation des six guides ARN (orange), chacun suivi par un backbone ARN (gris) et une queue poly-T (bleue) sous le contrôle du promoteur U6A de blé tendre (vert).

terminale et une partie C-terminale, qui sont toutes deux fixes quelle que soit la protéine TAL, et une partie centrale qui est, elle, spécifique de la cible (Figure 29). Cette partie centrale est une succession de séquences identiques comportant des SNP au acides aminés 12 et 13 qui feront la spécificité à la cible. Ces protéines ont une forme hélicoïdale afin de suivre la conformation en double hélice de la molécule d'ADN (Figure 30).

3.3.2.2 Cibles CRISPR et dCAS9

Ces guides ont été dessinés en respectant des critères stricts pour le dessin de guide CRISPR : la séquence doit faire 20pb, doit commencer par un G et doit être suivie d'une séquence dite PAM (NGG) non intégrée dans la séquence qui sera synthétisée mais qui servira de repère à la CAS9 sur la séquence cible. Chacun des guides est placé sous le contrôle du promoteur du gène U6 du génome A de blé tendre (U6A) et est suivi par la séquence codante pour un backbone ARN pour guide CRISPR (partie reconnue par la CAS9) déjà utilisé chez le blé tendre (189). Les six séquences U6A-guide-backbone sont mises les unes à la suite des autres séparées par une queue poly T de 7 nucléotides, afin de s'assurer de la fin de la transcription du guide couplé au backbone (Figure 31), et synthétisé dans un vecteur plasmidique (Annexe 1).

Pour ce qui est de la protéine CAS9, nous avons choisi d'utiliser la version mutée de la protéine CAS9, la dead-CAS9 ou dCAS9. Cette version de la protéine CAS9 porte les mutations D10A et H840A, c'est-à-dire que la séquence ADN codant pour la protéine a été mutée pour que le codon codant pour l'acide aminé 10 ne code plus pour un aspartate (D) mais pour une alanine (A) et que celui codant l'acide aminé 840 ne code plus pour une histidine (H) mais aussi pour une alanine (A). Ces deux acides aminés sont considérés comme étant les sites enzymatiques responsables des CDB induites par CAS9 et ainsi mutés, celle-ci conserve son affinité pour le guide CRISPR mais perd

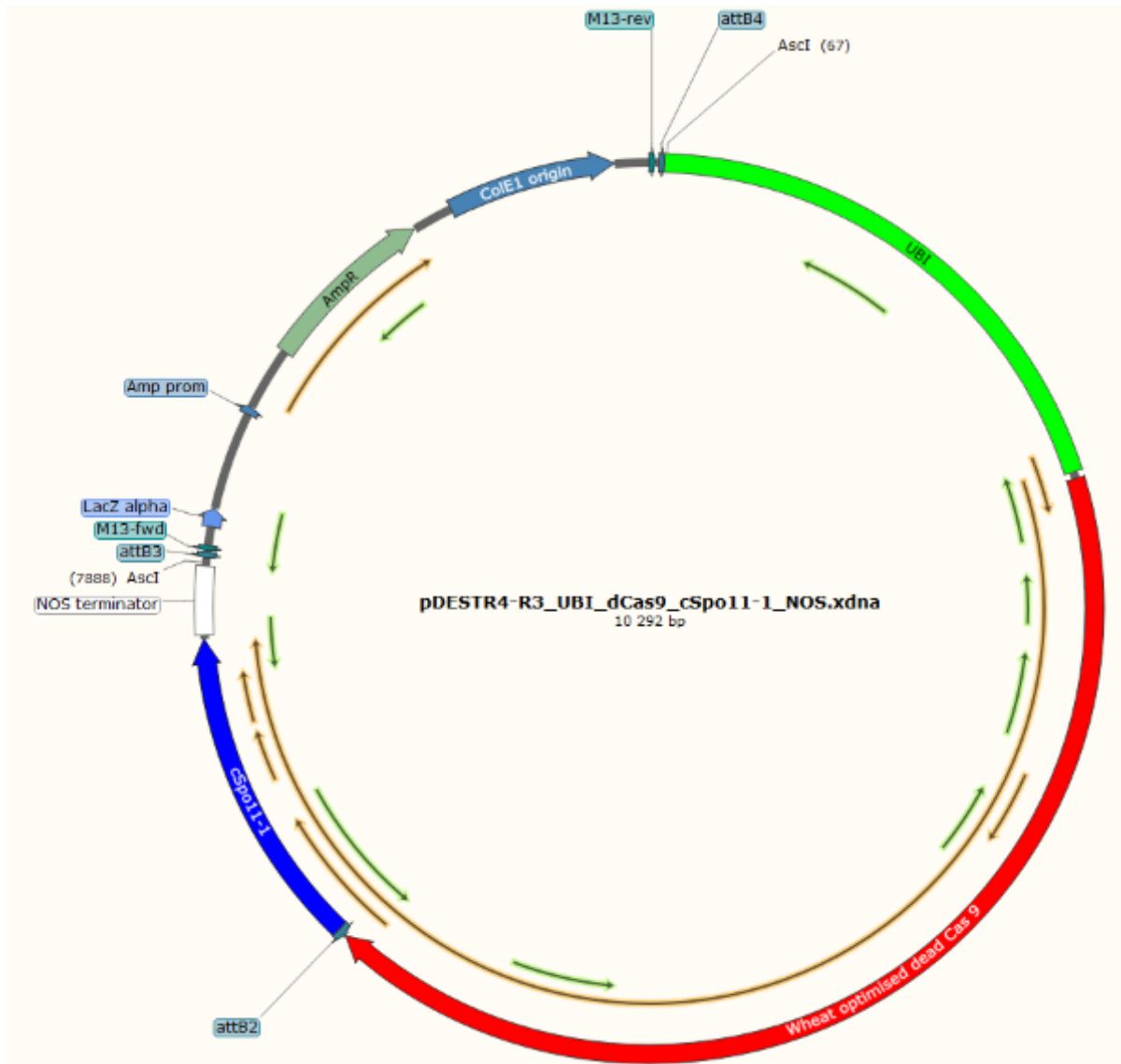


Figure 32 : Schématisation du vecteur plasmidique contenant la dCas9 (Wheat optimised dead Cas9) fusionné à la séquence codante du gène Spo11-1 (cSpo11-1) placé sous le contrôle du promoteur UBI). AmpR : gène de résistance bactérien à l'ampicilline. NOS terminator : terminateur du gène de la nopaline synthase. ColE1 origin : origine de répliation du vecteur. attB2 et attB4 : bornes de recombinaison Gateway. AscI : site enzymatique de linéarisation du vecteur pour utilisation en biolistique.

sa capacité à couper l'ADN. La séquence codante pour la dCAS9 est placée en 5' du CDS codant pour la protéine SPO11-1 de façon à maintenir le cadre de lecture et obtenir après transcription et traduction une protéine de fusion dCAS9-cSPO11-1, sous le contrôle du promoteur UBI, suivant le protocole de clonage Gateway (chapitre 3.4.1) (Figure 32).

3.4 Elaboration des constructions plasmidiques

Les constructions ont été élaborées suivant le protocole de clonage Gateway™ à trois entrées de Invitrogen™ (Figure 33). Ce système fait appel à la recombinaison homologue entre de courtes séquences ADN flanquant les différentes parties que l'on souhaite mettre bout à bout, appelées par la suite « entrées ». L'entrée 1 est le promoteur, l'entrée 2 est le domaine de liaison à l'ADN (TALE ou CRISPR) et l'entrée 3 est la séquence du gène Spo11-1 ou Spo11-2.

3.4.1 Construction des vecteurs plasmidiques

L'entrée numéro un consiste en la séquence du promoteur du gène codant pour l'Ubiquitine de mais inséré dans un plasmide pDONR P4-P1R™. Ce promoteur a déjà démontré son efficacité au laboratoire et dans la littérature (260). Par ailleurs, la définition des bornes des promoteurs endogènes des gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé n'a jamais été faite et leur efficacité n'a jamais été prouvée. Pour le domaine de liaison à l'ADN (TALE ou CRISPR), celui-ci a été élaboré à partir des séquences déterminées dans le chapitre précédent. Ces séquences ont été confiées à GeneArt® afin de synthétiser une séquence ADN codant pour la protéine TAL spécifique de chacune des séquences. Ainsi ce sont trois séquences ADN codant pour trois protéines TAL différentes qui ont été synthétisées et clonées chacune dans un vecteur pDONR221™. Ceux-ci correspondent à l'entrée numéro deux du système Gateway™. En ce qui concerne l'entrée 3, les séquences ADN

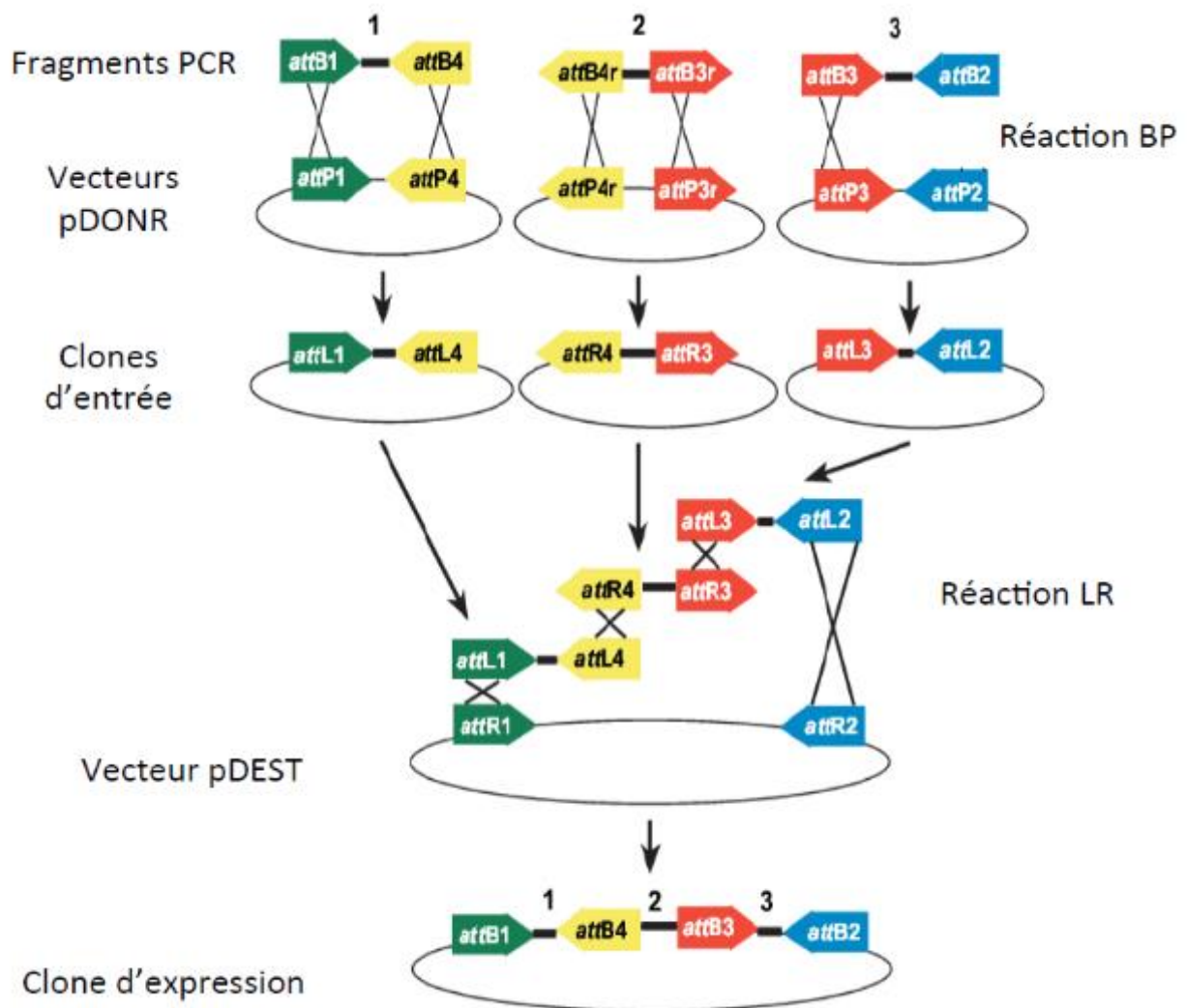


Figure 33 : Clonage plasmidique Gateway à trois entrées. Trois produits PCR flanqués des sites spécifiques attB ou attBr et trois vecteurs Donneurs (pDONR) sont utilisés dans des réactions de recombinaison BP séparées pour générer trois clones d'entrée. Les trois vecteurs d'entrée et un vecteur de destination (pDEST) sont utilisés dans une réaction de recombinaison LR pour créer un vecteur d'expression contenant les trois fragment d'ADN de départ. Multisite Gateway® Pro User Guide, Invitrogen®.

codant les gènes Spo11-1 et 2, dans lesquelles les deux premiers introns ont été conservés (Spo11-1 et Spo11-2) ou non (cSpo11-1 et cSpo11-2), ont été synthétisées, accompagnées de la séquence du terminateur de la nopaline synthase 3'NOS et clonées dans un vecteur pDONR P2R-P3™. La séquence 3'NOS est utilisée ici comme un signal de polyadénylation fort, couramment utilisé pour assurer l'arrêt de la transcription des gènes clonés en vecteur plasmidique (260).

Les 3 entrées sont clonées dans un vecteur de destination pDEST R4-R3™ en suivant le protocole du kit Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix de Invitrogen™ (Figure 28). La réaction se déroule dans un tube de 1,5 mL à température ambiante. Entre 50 et 150 ng de chaque vecteur d'entrée pour un volume total compris entre 1 et 7 µL sont mélangés à 1 µL du vecteur de destination à une concentration de 150 ng/µL. Le mélange est ensuite complété avec un tampon TE 1/10 à pH 8,0 pour atteindre un volume de 8 µL. Le mélange d'enzymes LR Clonase™ II est décongelé sur glace pendant 2 minutes environ et est ensuite vortexé brièvement deux fois (2 secondes à chaque fois). 2 µL de ce mélange d'enzyme sont ajoutés à la réaction dans le tube de 1,5 mL. La réaction est ensuite vortexée et centrifugée brièvement afin de bien mélanger et de ramener toute la réaction dans le fond du tube. La réaction est incubée toute la nuit à 25°C. Le lendemain, pour stopper la réaction enzymatique, 1 µL de protéinase K est rajouté à celle-ci. Le mélange est vortexé, centrifugé puis incubé à 37°C pendant 10 minutes, pour laisser le temps à la protéinase de bien dégrader la LR Clonase II. Une fois la réaction stoppée, celle-ci peut être stockée à -20°C ou utilisée pour transformer des bactérie E. coli.

3.4.2 Constructions réalisées

Six premiers vecteurs plasmidiques contenant chacun une combinaison entre un des trois domaines TAL de liaison à l'ADN et un des deux gène Spo11 dans lequel n'a été retenu que les deux premiers

Table 3 : Constructions réalisées et leur composition.

Construction	Promoteur	Domaine de liaison à l'ADN	Endonucléase	Version de l'endonucléase	Terminateur	Vecteur
TAL15-Spo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL28-Spo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL47-Spo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL15-Spo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL28-Spo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL47-Spo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	avec introns 1 et 2	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL15-cSpo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL28-cSpo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL47-cSpo11-1	UBI	TAL	SPO11-1	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL15-cSpo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL28-cSpo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
TAL47-cSpo11-2	UBI	TAL	SPO11-2	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3
dCas9-cSpo11-1	UBI	dCas 9	SPO11-1	CDS	3'NOS	pDESTR4-R3

introns ont été construits selon le protocole mentionné au chapitre précédent : TAL15-Spo11-1, TAL15-Spo11-2, TAL28-Spo11-1, TAL28-Spo11-2, TAL47-Spo11-1 et enfin TAL47-Spo11-2. Les vecteurs contenant le gène Spo11-1 font 9565pb et ceux contenant le gène Spo11-2 font 9552pb. Suite à la découverte du souci d'épissage (voir chapitre 4.2.5), trois autres constructions ont ensuite été réalisées comportant les trois domaines TAL précédemment utilisés, couplés cette fois-ci à l'ADNc du gène Spo11-1 (cSpo11-1) : TAL15-cSPO11-1, TAL28-cSPO11-1 et TAL47-cSPO11-1. Ces constructions ont une taille de 9343pb.

Enfin, six guides CRISPR ont été construits à partir de trois cibles situées dans des régions non recombinantes et de trois cibles situées dans des régions faiblement recombinantes. Tous les guides, chacun sous le contrôle d'un promoteur U6A de blé, ont été mis bout à bout dans une seule et même construction nommée « 6 guides CRISPR ». Deux constructions portant d'une part la séquence codante pour une CAS9 fonctionnelle et d'autre part la CAS9 mutée (dCAS9) couplée à l'ADNc de Spo11-1 ont été réalisées : CAS9 et dCAS9-cSpo11-1. Afin de produire une population de secours, une construction contenant le guide nommé GASR7 ayant été démontrée comme efficace dans la littérature, seule et sous le contrôle du même U6A, a aussi été créée.

Chacune des 11 constructions précédentes (guides CRISPR mis à part) est placée sous le contrôle du promoteur du gène ubiquitine de maïs noté pUBI et ayant déjà montré une bonne efficacité d'expression en transgénése chez le blé tendre au laboratoire (170, 261). Toutes les constructions réalisées sont spécifiées dans la Table 3 et les cartes correspondantes sont précisées en Annexe 1

3.4.3 Vérification et production des vecteurs plasmidiques

La souche E. coli TOP10 a été utilisée pour la transformation et la multiplication des vecteurs créés par LR suivant le protocole suivant : 2µL de LR sont mélangés à 25µL de TOP10 fraîchement

Table 4 : Vecteurs commerciaux utilisés et leur résistance antibiotique.

Vecteur	Souche bactérienne de multiplication	Antibiotique	Concentration
pDONR P4-P1R	<i>E. coli</i> TOP10	kanamycine	50 µg/mL
pDONR221	<i>E. coli</i> TOP10	kanamycine	50 µg/mL
pDONR221-zéo	<i>E. coli</i> TOP10	zéocine	25 µg/mL
pDONR pP2R-P3	<i>E. coli</i> TOP10	kanamycine	50 µg/mL
pDEST R4-R3	<i>E. coli</i> TOP10	ampicilline	100 µg/mL
pMDC123	<i>E. coli</i> TOP10	kanamycine	50 µg/mL

décongelés sur glace dans un tube à bouchon à vis de 2mL et laissés sur glace 30 minutes. Un choc de température est réalisé au bain marie à 42°C pendant 30 secondes, puis le mélange est laissé 2 minutes sur la glace. 125µL de milieu SOC sont rajoutés au mélange et le tube est incubé avec agitation 1h à 37°C pour débiter la régénération des bactéries. Ensuite 20 et 130 µL de mélange sont étalés sur deux boites de pétri, contenant du milieu LB agar figé additionné d'antibiotique. Les boites de pétri sont incubées une nuit à 37°C. La Table 4 précise la nature et la concentration de chaque antibiotique en fonction du vecteur plasmidique utilisé.

Une fois les colonies bactériennes développées, entre 5 et 10 colonies sont mises en culture liquide dans 3 mL de milieu LB liquide additionnés d'antibiotique correspondant à la résistance du vecteur, pendant une nuit à 37°C sous agitation. 2mL de culture sont prélevés pour extraction de vecteur plasmidique selon le protocole QIAprep® Spin Miniprep de chez QIAGEN™. La nature du vecteur plasmidique extrait est vérifiée par digestion enzymatique avec l'enzyme HaeIII. La réaction s'effectue dans un tube 1,5 mL dans lequel 10 µL de produit d'extraction sont mélangés à 1,5 µL du tampon NEB2 (correspondant à l'enzyme HaeIII de NEB). Ensuite, 3,4 µL d'eau up autoclavée et 0.1µL de l'enzyme HaeIII à 50u/µL sont ajoutés à la réaction. La réaction enzymatique est incubée 1h30 à 37°C et séparée sur gel d'agarose 2% TAE 0.5 pendant 4h à 90V. Le profil de digestion enzymatique est ensuite comparé au profil de digestion enzymatique théorique généré *in silico* grâce au logiciel Vector NTI. Une colonie présentant le bon profil de digestion enzymatique est sélectionnée et 100µL de la culture liquide sont ajoutés dans 125mL de milieu LB liquide additionnés d'antibiotique et incubé à 37°C sous agitation pendant une nuit. L'ADN plasmidique est ensuite extrait selon le protocole QIAGEN Plasmid Midi Kit de QIAGEN™.

3.4.4 Production de la cassette plasmidique pour la transformation par biolistique.

Afin d'assurer la conservation de l'intégrité de la construction lors du bombardement biolistique, le vecteur plasmidique est digéré de part et d'autre de la construction plasmidique afin de linéariser le plasmide et de retirer la partie bactérienne du plasmide. La digestion est effectuée à partir de 20µg de plasmide. Ceux-ci sont mélangés à 4 µL du tampon spécifique à l'enzyme de restriction et à 7.5µL d'enzyme de restriction à 10u/µL. Enfin le volume est ajusté à 37µL avec de l'eau up autoclavée. La digestion enzymatique est incubée 2h à 37°C et séparée sur gel d'agarose 0.8% à 70V pendant un temps suffisant pour pouvoir séparer les deux bandes résultant de cette digestion. La bande d'intérêt est purifiée selon le protocole décrit dans Tassy et al. en 2014 (261). Ces cassettes ont été introduites grâce à la transformation par Biolistique dans des embryons hybrides immatures de blé tendre afin de générer des plantes transgéniques T0. Celles-ci ont été cultivées en serre OGM dédiée afin de produire une descendance T1

3.5 Culture des plantes

Dans cette étude, trois génotypes de blé tendre ont été utilisés : BobWhite (BW; le cultivar BWS26), Chinese Spring (CS) et Courtot (Ct). Les graines des plantes mères sont semées en pot de germination et laissées pousser 1 semaine. Ensuite les plantules sont transférées dans des pots de 4 L avec du terreau de culture additionné d'engrais à diffusion lente (Nutricote®) et cultivées en serre dans les conditions suivantes : Cycle jour/nuit de 16h/8h avec une température de 22°C/18°C, une luminosité de 200 µmol m⁻² s⁻¹, et une lutte biologique intégrée. Pour les variétés nécessitant une période de vernalisation, préalablement au repotage en pot de 4L, les plantules sont placées à 6 ° C pendant deux mois, une semaine après le semis.

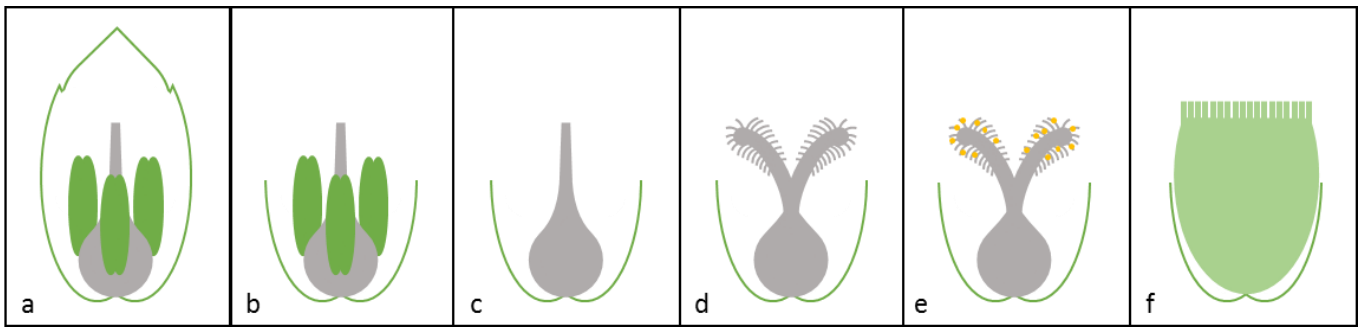


Figure 34 : Etapes d'émasculation de la fleur de blé. a : une fleur de blé totalement immature (couches vertes externes : glumes; structures vertes: anthères immatures; structure grise: carpelle immature (stigmate + ovaire)). b : les glumes sont coupées pour libérer les anthères immatures et le stigmate. c : les anthères immatures sont supprimées. d : après 2-3 jours, le stigmate est complètement développé. e : le pollen est déposé sur le stigmate pour la fécondation. f : après 11-15 jours, les grains immatures ont suffisamment poussé et sont récoltées pour être l'extraction d'embryons immatures pour la transformation par biolistique.

3.6 Production d'embryons hybrides

Les croisements sont réalisés dans des infrastructures en conditions climatiques contrôlées afin de permettre une formation et une croissance optimale des embryons. Afin de produire des embryons hybrides, les épis immatures des plantes mères entrant dans leur période de floraison sont émasculés à l'aide de ciseaux et de pinces de précision (Figure 34). Les épis en floraison et sur le point de fleurir sont mis de côté ou coupés pour éviter l'autopollinisation. Les épis au bon stade doivent être suffisamment sortis de leur gaine et leurs étamines doivent toujours être vertes. Dans un premier temps, chaque fleur est étêtée pour libérer le stigmate et les anthères sans les blesser. Ensuite, les anthères sont soigneusement retirées avec des pinces, en évitant de les ouvrir. Le plus grand nombre de fleurs possible est émasculé, mais les plus petites fleurs situées au sommet de l'épi sont retirées. Les épis ainsi émasculés sont protégés individuellement avec un sac en plastique perméable à l'humidité en attendant la pollinisation.

Au minimum 3 jours après l'émascultation, afin de laisser le temps aux stigmates de se développer, les épis sont pollinisés avec le pollen du parent mâle. Le pollen est collecté à partir d'anthères matures fraîches sur une boîte de Pétri en verre nettoyée à l'éthanol avec des pinces aussi nettoyées à l'éthanol. Les grains de pollen collectés sont rassemblés grâce à un pinceau fin sur un bord de la boîte de Pétri en verre. Le sac de protection est retiré et grâce au pinceau fin, des grains de pollen sont déposés sur le stigmate de chaque fleur. La boîte de Pétri en verre est maintenue sous l'épi pendant la pollinisation pour récupérer les grains de pollen qui n'adhèrent pas au stigmate et tombent. Les épis sont tapotés doucement pour éliminer le surplus de pollen. À la fin du processus, le sac de protection est remplacé pour éviter la pollinisation croisée.

Après 11 à 15 jours suivant la pollinisation, la fleur pollinisée devrait avoir donné un grain toujours immature à ce stade de développement. Pour savoir si les grains sont prêts à être collectés, un grain

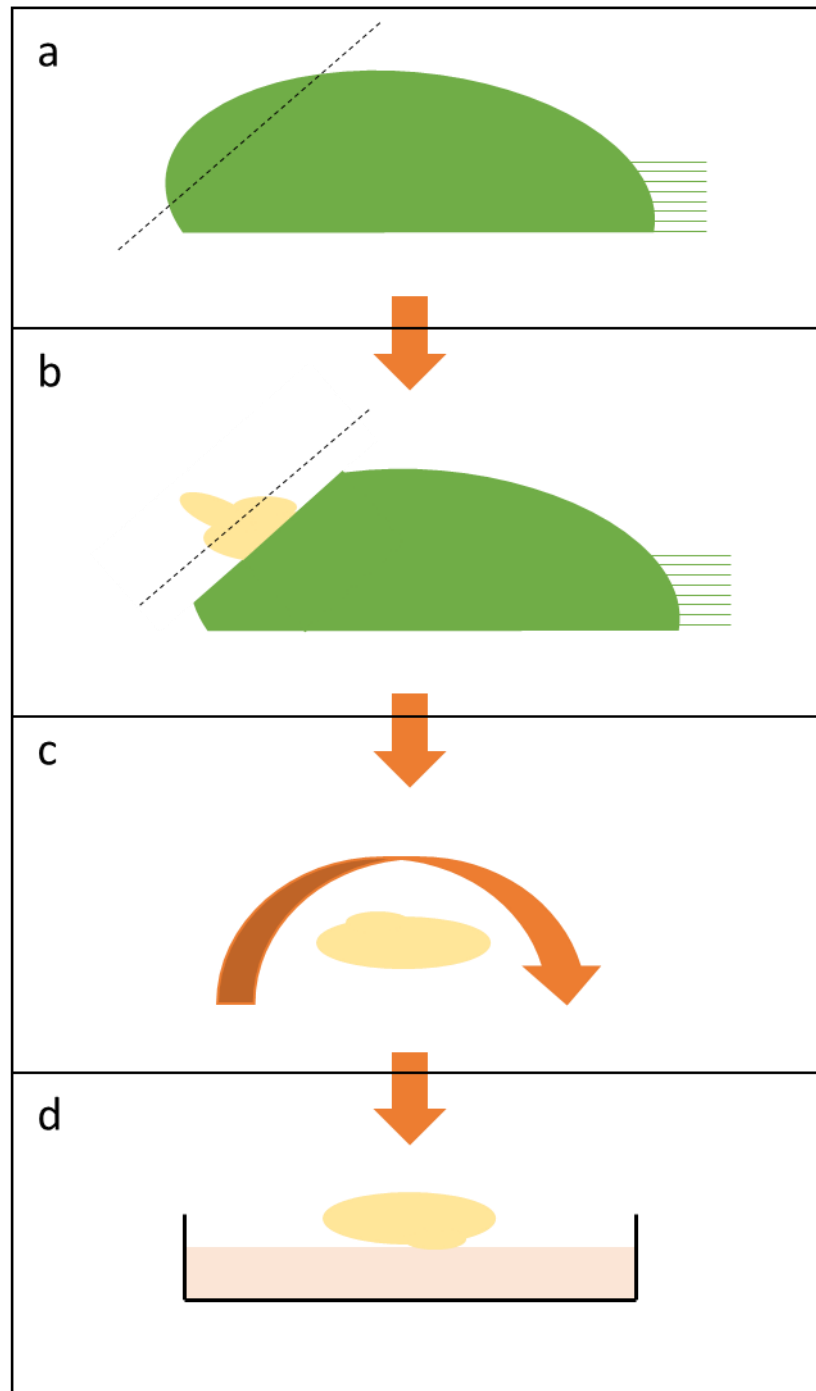


Figure 35 : Schéma de dissection des grains immatures pour la récupération des embryons immatures. a : le grain immature (vert) est posé à plat, le sillon face au sol et la partie basale est scalpé en biais (ligne pointillée). b : l'embryon apparent (beige) est à son tour scalpé au niveau de la radicule (ligne pointillée) si cela n'a pas été fait en même temps que l'étape a. c : l'embryon est retourné pour être ensuite placé sur le milieu de plasmolyse (rose) (d). D : l'embryon immature est placé sur le milieu de plasmolyse.

est prélevé et ouvert pour libérer l'embryon. Si la taille de l'embryon est d'environ un à deux millimètres, il convient à la transformation par biolistique et les grains restant sur l'épi sont récoltés. Si l'embryon est trop petit, les grains restant sont laissés sur la plante jusqu'à ce qu'ils atteignent la bonne taille. Dans des conditions stériles, les grains immatures sont lavés à l'éthanol, séchés, rincés à l'eau distillée autoclavée, séchés à nouveau et placés dans un tube en plastique stérile (par exemple, un tube Falcon® de 50 mL) à 4 ° C dans une chambre froide ou un réfrigérateur jusqu'à utilisation.

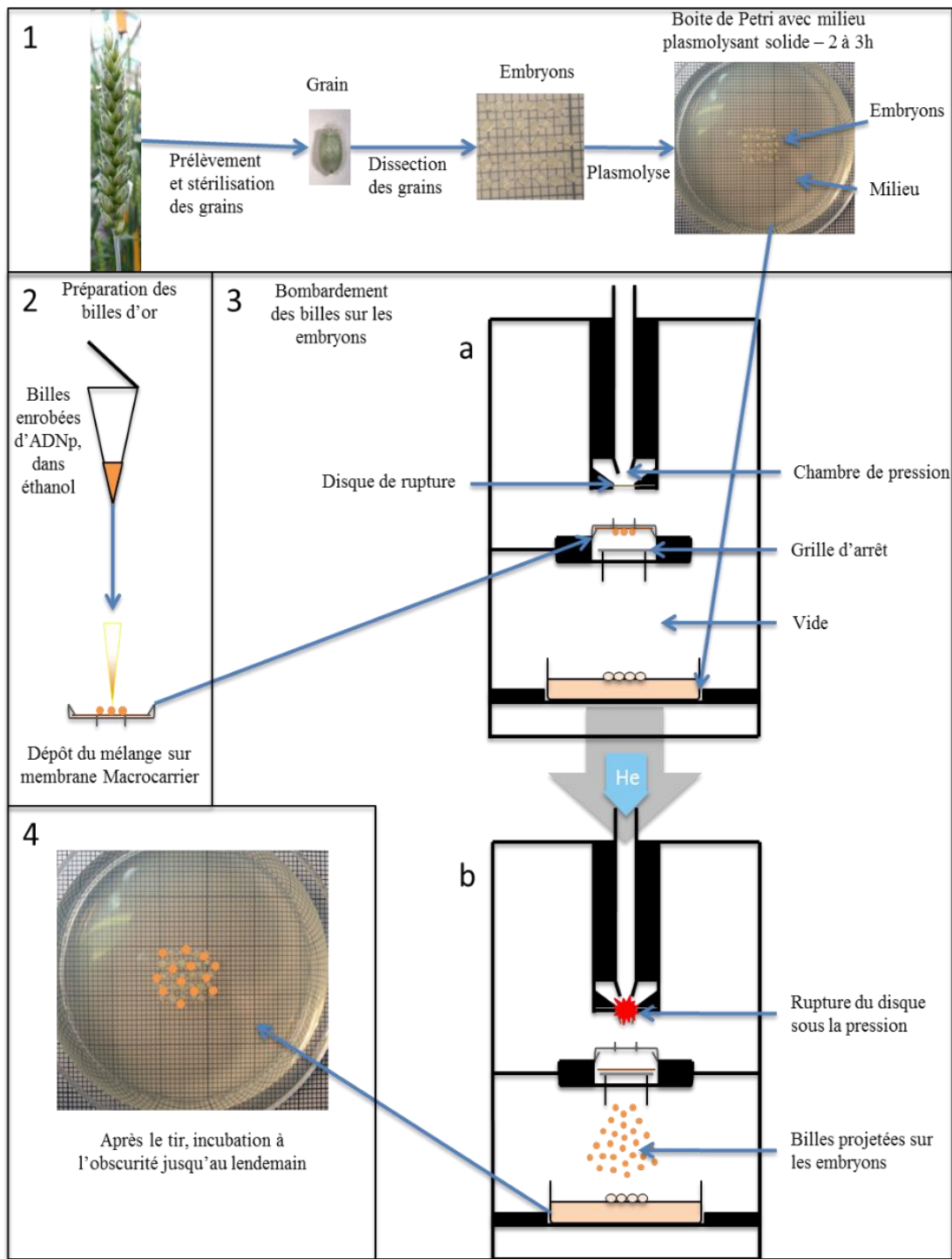


Figure 36 : Technique de biolistique appliquée sur embryons immatures de Blé. 1 : Prélèvement et dissection des grains afin d'obtenir les embryons immatures. Les embryons sont ensuite placés sur un milieu plasmolysant solide pendant 2 à 3h. 2 : enrobage des microparticules (billes d'or) avec les constructions à bombardées sous forme d'ADNp. 3 : Bombardement des microparticules sur les embryons plasmolysés. Le vide est fait avant le tir (a) et de l'hélium est injecté derrière le disque de rupture pour déclencher le tir (b). 4 : Les embryons bombardés sont ensuite incubés à l'obscurité jusqu'au lendemain du tir, temps optimal pour que les cellules récupèrent du tir.

3.7 Génération des plantes transgéniques

La technique de production de plantes transgéniques retenue est celle de la biolistique suivie d'étapes de régénération *in vitro* sur milieu de sélection. Cette technique requiert comme matériel de base des embryons immatures de blé tendre. La liste et la composition des milieux sont indiquées en Annexe 2.

3.7.1 Extraction des embryons

Dans des conditions stériles, les grains immatures sont lavés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 20%, additionnée d'une goutte de tween 20 pour 200 mL puis rincés à l'eau distillée autoclavée et séchés. Les embryons immatures sont isolés sous loupe binoculaire dans des conditions stériles. Le grain immature est sectionné en partie basale afin de libérer l'embryon (Figure 35). La racine de celui-ci est ensuite retirée pour empêcher la germination spontanée de l'embryon. Le reste de l'embryon composé du scutellum et du coléoptile est transféré à l'envers sur un milieu solide de plasmolyse, préalablement coulé dans une boîte de Pétri stérile de petit diamètre. Les embryons ainsi disposés sur le milieu de plasmolyse sont laissés minimum 3h à 30°C afin de laisser le temps aux cellules de parfaire la plasmolyse. Cette étape de plasmolyse est indispensable car elle va permettre aux cellules de se vider de leur eau afin d'être moins sensibles à l'éclatement lors du bombardement de particules.

3.7.2 Biolistique

Le bombardement de particules est effectué à l'aide de l'appareil BioRad PDS 1000 He avec un disque de rupture calibré à 900 psi et une distance à la cible de 7 cm (Figure 36). Toutes les manipulations doivent être effectuées dans des conditions stériles. Les disques de rupture et les

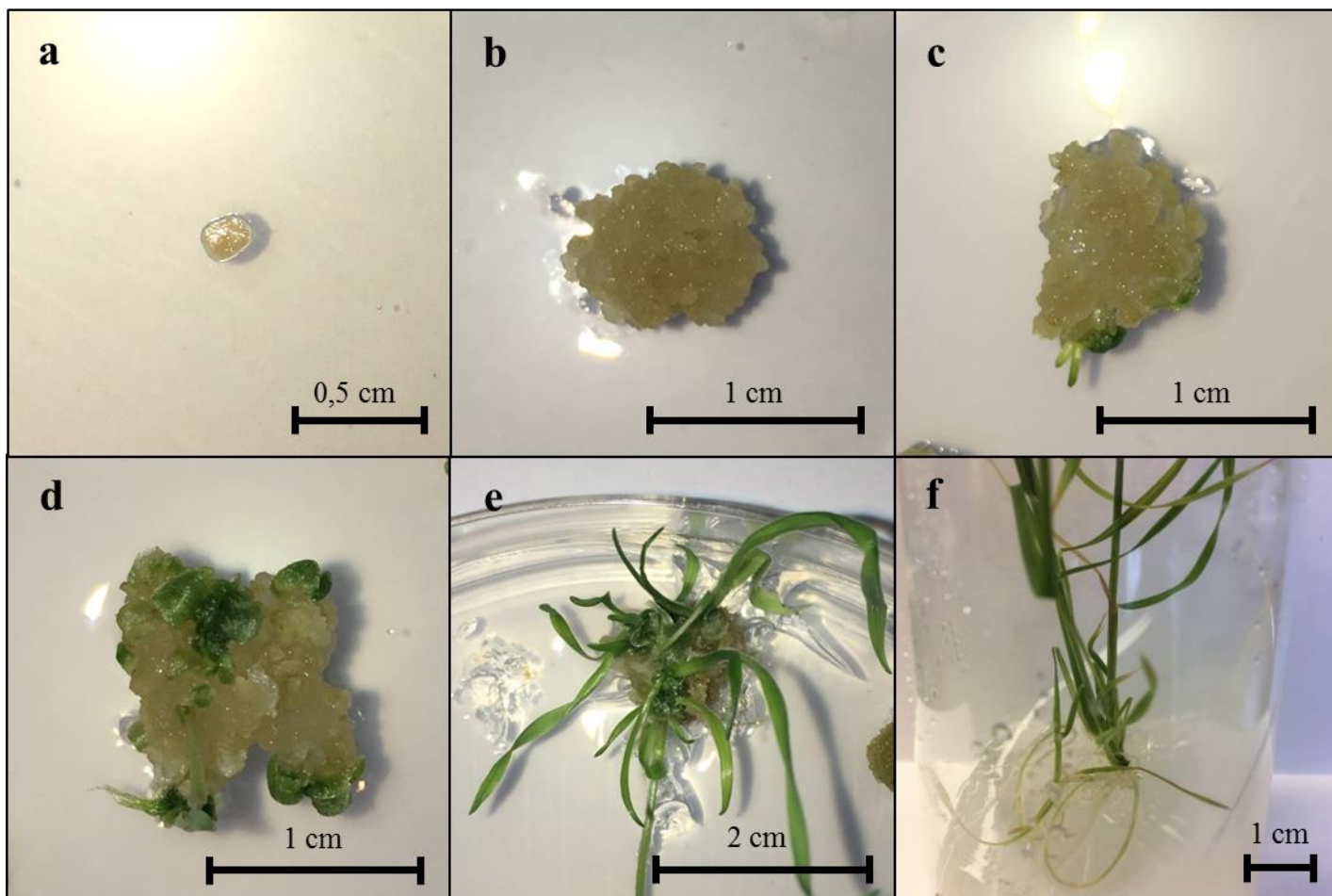


Figure 37 : Les étapes de culture in vitro suivant la transformation par biolistique des embryons immatures. a : un embryon juste après la transformation. b : Étape de callogenèse (milieu MSE3). c : Première étape d'organogenèse (feuilles) sur le premier milieu de sélection PMI1. d : Développement des feuilles sur le deuxième milieu de sélection PMI2. e : Développement des feuilles sur le troisième milieu de sélection PMI3. f : Seconde étape d'organogenèse (racines) et développement des feuilles juste avant le transfert en serre.

disques supports sur lesquels est déposé l'ADN sont lavés à l'éthanol et laissés à sécher. Un tube contenant un aliquot de 1 mg de billes d'or de 0,6 μm de diamètre repris dans 20 μL d'éthanol est placé sous sonication pendant 5 min afin de séparer les particules d'or les unes des autres en douceur. Chaque cassette de construction plasmidique est ajoutée aux billes d'or en quantité équimolaire sans dépasser la quantité totale de 1 μg d'ADN. 20 μL de spermidine à 0,1 M et 50 μL de CaCl_2 à 2,5 M sont ensuite mélangés dans un autre tube avant d'être ajoutés au mélange billes/ADN. La solution obtenue est vortexée doucement pendant au moins 15 minutes, puis centrifugée pendant 1 minute. Le surnageant est jeté et le culot de billes est lavé avec 200 μL d'éthanol anhydre, centrifugé et remis en suspension dans 100 μL d'éthanol anhydre. 10 μL sont utilisés pour chaque tir et sont soigneusement déposés sur un disque support préalablement placé sur un support de montage conformément au manuel d'utilisation du dispositif BioRad PDS 1000 He. Le montage final est effectué comme décrit dans le manuel d'utilisation du dispositif BioRad PDS 1000 He. La boîte de Pétri contenant les embryons immatures plasmolysés est ouverte sous conditions stériles et placée à l'intérieur du dispositif BioRad PDS 1000 He à une distance de 7 cm du disque de rupture. Ensuite, le tir est effectué conformément au manuel d'utilisation. Une fois le bombardement de particules terminé, la boîte de Pétri est refermée et placée à 30°C pendant une nuit avant de commencer le protocole de culture *in vitro*.

3.7.3 Culture *in vitro*

La culture *in vitro* a été réalisée comme décrit dans Tassy et al. en 2014 (261), sur des milieux sélectifs enrichis au mannose qui permet la sélection des plantes transformées qui portent un gène codant pour une Phospho-Mannose Isomérase (PMI) et qui sont donc aptes à métaboliser le mannose (262, 263) (Figure 37). Cette sélection est divisée en plusieurs étapes de multiplication



Figure 38 : Acclimatation des jeunes plantules à la sortie de l'étape de culture in vitro. Les jeunes plantules sont délicatement sorties du milieu gélosé et sont repiquées dans un terreau spécial semis, mises à baigner dans un bac d'eau et placées dans une armoire de culture à la température et à l'humidité contrôlées.

cellulaire et de régénération des tissus. Après une nuit à 30°C, les embryons immatures fraîchement transformés sont placés sur un milieu de callogenèse enrichi en 2,4-D pendant 2 semaines. Les cals générés sont transférés sur 2 milieux sélectifs consécutifs enrichis en mannose et en hormones végétales de synthèse (AIA, Acide indole 3-acétique et BAP, benzylaminopurine) respectivement pour la sélection et l'organogenèse des feuilles pendant 2 semaines chacun. Le second milieu est moins sélectif que le premier pour alléger la sélection et laisser pousser les plantules en régénération. Les plantules régénérées sont transférées vers un troisième milieu plus sélectif et de même composition que le précédent pour la sélection finale des plantules transformées. Cette étape permet d'éliminer les événements dits « échappés » (les plantes qui survivent à la sélection mais ne sont pas transformées). Après 2 semaines, les plantules survivantes sont transférées dans un quatrième milieu sélectif enrichi en mannose et en hormones végétale de synthèse pour l'organogenèse des racines.

3.7.4 Criblage PCR et culture en serre S2

Une fois que les plantules ont développé des racines et des feuilles dans le dernier milieu de sélection, chacune d'elles est transférée individuellement dans de petits pots avec un sol de germination et placée dans une armoire d'acclimatation pendant 1 à 2 semaines avec un cycle circadien de 16h/8h avec 22°C/18°C et 60% d'humidité (Figure 38). Elles sont ensuite systématiquement soumises à une période de 2 mois à 6°C pour réaliser la vernalisation et synchroniser la floraison. Les plantules sont sujettes au dessèchement lors des premiers jours d'acclimatation. Le prélèvement de feuilles pour l'extraction d'ADN est effectué une fois que de nouvelles feuilles apparaissent, c'est-à-dire environ 1 à 2 semaines d'acclimatation ou après la période de vernalisation suivant la quantité de feuilles disponible.

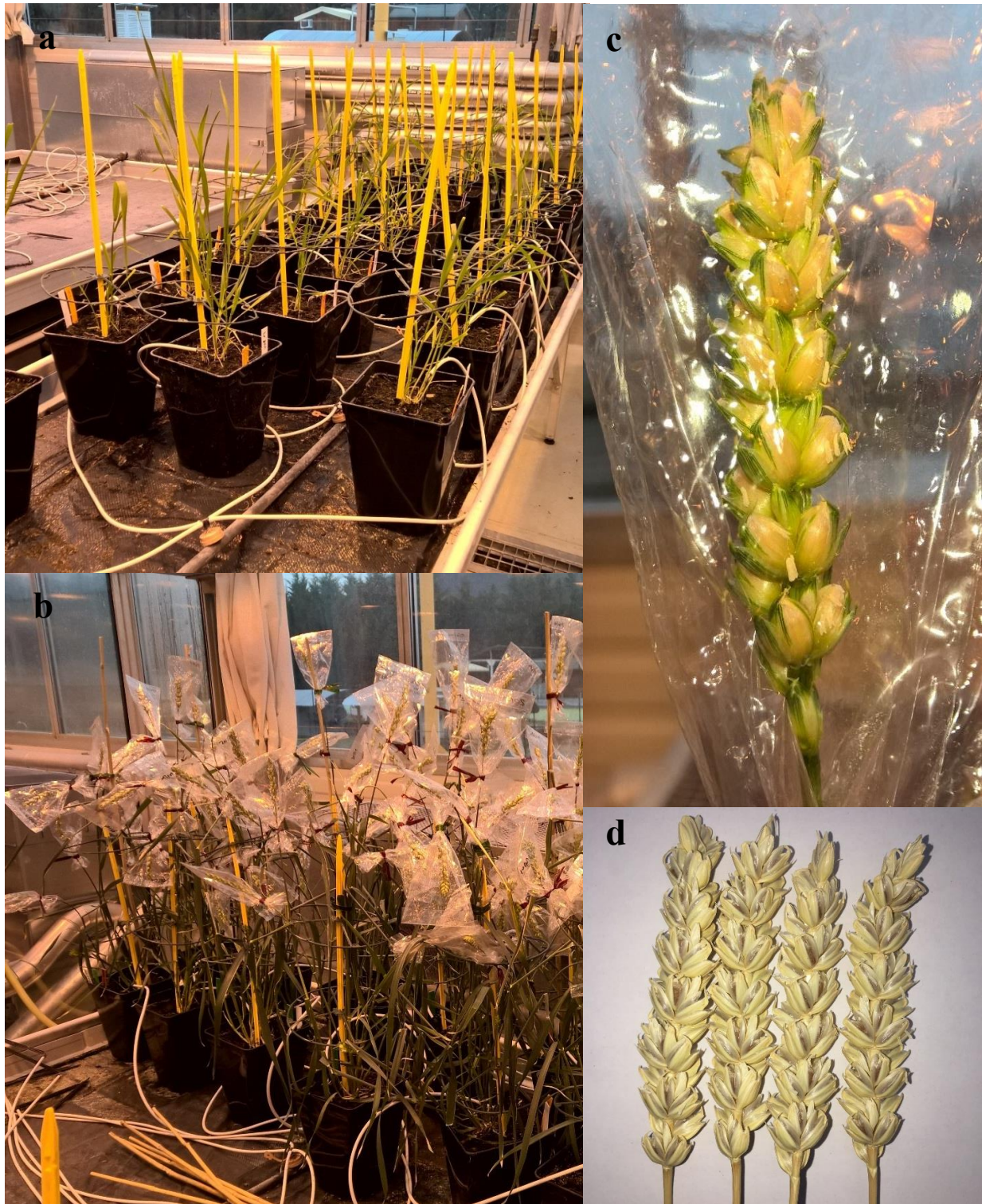


Figure 39 : Culture en serre OGM : a : Après 2 semaines dans la chambre d'acclimatation et 2 mois de vernalisation, les plantes transgéniques T0 (positives en PCR) sont transférées en serre OGM dans des pots de 4 L avec un terreau de culture. b : Floraison des plantes transgéniques T0. Chaque épi est isolé dans un sac en plastique perméable à l'humidité pour une autopolinisation. c et d : Épis transgéniques T0 entièrement fertiles en cours de maturation (c) et prêt à être récoltés (d).

L'ADN de chaque plante transgénique est extrait à partir de 20 à 100 mg de jeune feuilles à l'aide du système d'extraction d'ADN automatisé Oktopure et du kit d'extraction d'ADN de plante Sbeadex™ (LGC Limited©). Les plantes transgéniques ont été détectées par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les fragments d'ADN insérés et le protocole Amplitaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems™). La transformation a été évaluée par PCR sur transgène grâce à des amorces spécifiques avec, si possible, trois échantillons de feuilles provenant de trois tiges différentes de la même plante. Pour éviter les chimères, les plantes ont été considérées comme transformées lorsque tous les échantillons de la même plante sont positifs à la PCR. Des amorces microsatellites spécifiques ont été utilisées sur chaque échantillon (WMS257, Annexe 3) en tant que contrôle PCR. Les séquences et températures de fusion de toutes les amorces utilisées sont spécifiées en Annexe 3.

Chaque PCR est réalisée à partir de 2µL d'ADN à 10ng/µL. 5µL du mix Amplitaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems™) sont ensuite rajoutés avec 1µL de GC enhancer (fournis dans le kit) et 0.25µL de chacune des amorces à 10nM (0.4uM final). Enfin, le volume de réaction est ajusté à 10µL avec de l'eau up autoclavée. Le programme PCR utilisé est indiqué en Table 5.

Les plantules sélectionnées sont transférées individuellement dans des pots de 4 L et placées dans une serre dédiée aux OGM, avec un cycle circadien de 16h/8h avec une température respective de 22°C/18°C. On laisse les plantules pousser jusqu'à maturation des grains pour les étapes suivantes (Figure 39).

3.7.5 Récolte des grains T1

Les grains sont récoltés 2 mois suivant la floraison pour s'assurer de la complète maturation de ceux-ci. Chaque épi est coupé et placé dans une petite batteuse de paille pour désolidariser les

Table 5 : Programme PCR pour le criblage des transgènes

Température (°C)	Temps	Nombre de cycle	Etape
95	10min	1	Dénaturation
95	30sec	35	Dénaturation
TM des amorces	30sec		Hybridation
72	60sec/kb		Elongation
72	5min	1	Fin de l'élongation
15	infini	1	Stase

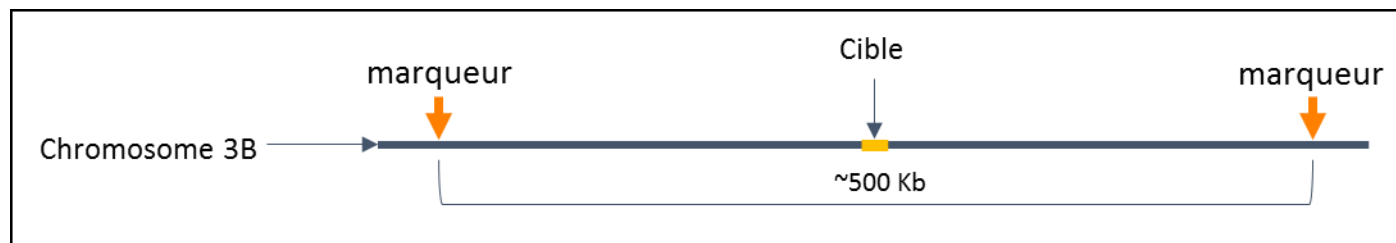


Figure 40 : Stratégie de génotypage des population T1. Chaque cible est encadrée par des marqueurs distants polymorphe entre les deux parents, Chinese Spring et Courtot.

grains de l'épi. Les grains récoltés sont placés dans des sachets hermétiques en plastique et placés dans une enceinte spéciale pour la conservation des grains, avec une température constante de 7°C et une humidité inférieure à 30%. Ils y restent minimum une semaine afin de lever la dormance des grains, qui se serait installée à la fin de la maturation. Une fois la dormance levée, les grains sont semés en plaque de culture de 96 puits et laissés pousser une semaine afin de pouvoir récolter les feuilles pour extraction ADN selon le protocole décrit au chapitre 3.7.4.

3.8 Génotypage des populations T1

L'étude de la répartition de la recombinaison méiotique le long des chromosomes est, de manière classique, réalisée à partir de l'étude globale des SNP dans des populations issues de croisement entre deux individus suffisamment différents pour qu'une majorité des SNP soit polymorphe entre ces deux individus (Figure 40). Un SNP aura donc minimum deux versions provenant soit du parent 1 soit du parent 2. Ainsi, lors d'une marche sur un chromosome, si l'origine des SNP change passant d'un parent à l'autre, alors on peut traduire ceci par l'apparition d'un point de recombinaison entre les deux SNP entre lesquels le changement a eu lieu. Ici nous appliquons la même technique de détection des points de recombinaison mais à l'échelle locale. Il nous faut donc travailler sur une population issue d'un croisement entre deux variétés de blé tendre de provenances différentes. L'identification de l'apparition d'un point de recombinaison au niveau de la cible du système SpiX se fait de la même manière par l'identification de la provenance des portions génomiques de part et d'autre de la cible SpiX grâce à des SNP.

3.8.1 Stratégie

La stratégie de génotypage des SNP retenue est la technologie KASPar (Figure 41) (264) qui consiste en une PCR faisant intervenir trois amorces : une commune dessinée dans une région non polymorphe et deux allèle-spécifiques incorporant un SNP identifié entre les deux parents du croisement et couplées chacune à un fluorophore différent. L'amorce commune sera normalement utilisée pour la réaction de PCR quel que soit l'individu. En revanche, les amorces spécifiques seront utilisées pour la réaction en fonction de l'allèle porté par l'individu génotypé et celle utilisée émettra alors une fluorescence grâce au fluorophore libéré. Ainsi en calculant le ratio de la fluorescence d'un fluorophore sur l'autre on peut savoir quelle amorce a été utilisée préférentiellement dans la réaction de PCR et donc quel allèle a été hérité par l'individu génotypé et descendant du croisement.

3.8.2 Recherche de marqueurs

Cette stratégie repose sur la présence d'un polymorphisme suffisant entre les deux parents utilisés pour la production d'embryons hybrides pour que les régions ciblées par la technologie SpiX possèdent un minimum des SNP identifiés entre les deux parents du croisement. Afin de pouvoir trouver les SNP permettant la mise au point du génotypage par technologie KASPar, une marche sur le génome est effectuée en s'éloignant de part et d'autre de la cible SpiX. Dès qu'un SNP polymorphe entre les deux parents est découvert, les amorces sont dessinées et testées avec le protocole KASPar (voir chapitre 3.8.3). A chaque amorce spécifique de chaque allèle est accolée une extension spécifique d'un fluorophore pour la distinction entre l'un ou l'autre des deux allèles lors de la lecture. Trois types de marqueurs ont été utilisés pour la recherche de polymorphisme entre les deux parents : des marqueurs SNP, des marqueurs SSR et des marqueurs ISBP (Insertion

Table 6 : programme PCR de protocole KASPar.

Température (°C)	Temps	Nombre de cycle	Etape
94	15min	1	Dénaturation
94	20sec	10 avec un delta de -0.8°C par cycle	Dénaturation
65	1min		Hybridation
94	20sec	40	Dénaturation
57	1min		Hybridation
15	infini	1	Stase

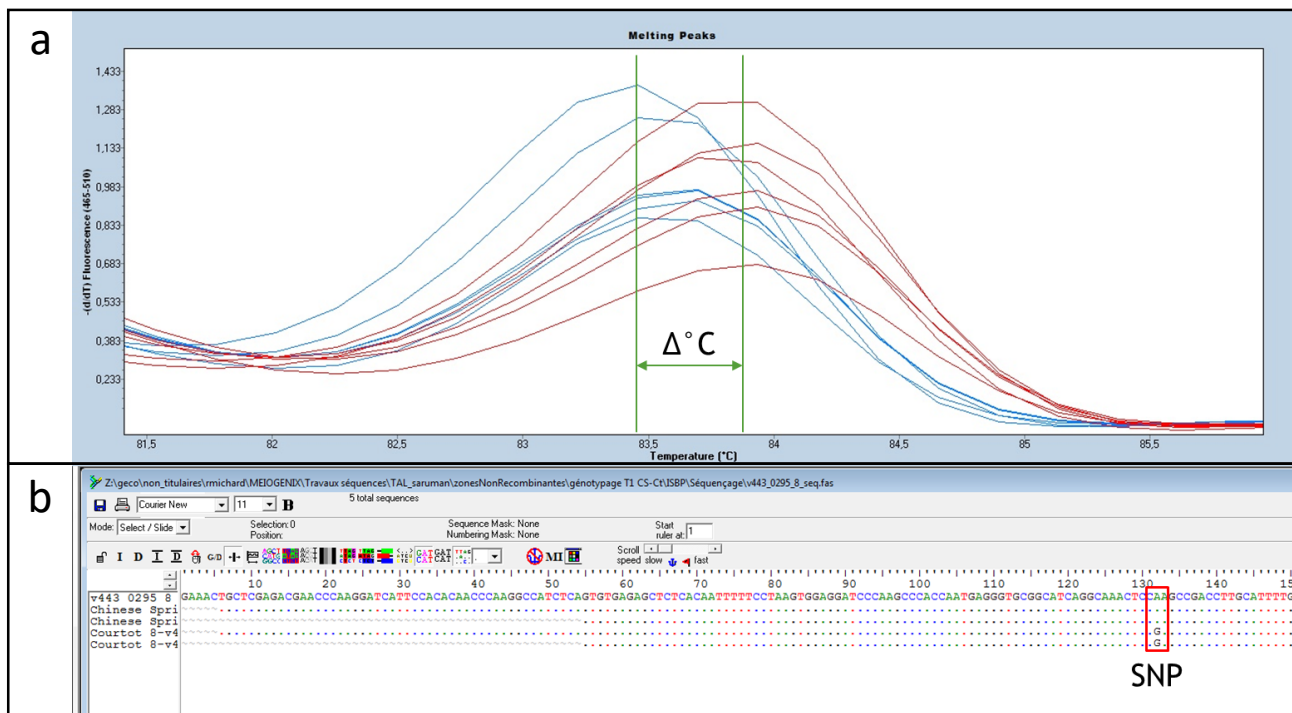


Figure 42 : Découverte de SNP de novo par crible de marqueurs ISBP. a : représentation d'une courbe de dissociation de produits PCR obtenus pour le même marqueur ISBP pour chacun des parents, Chinese Spring en bleu et Courtot en rouge. Le delta température entre les deux courbes est indiqué par la double flèche verte. b : résultats du séquençage des amplicons PCR du marqueurs pour les deux parents. Le SNP découvert est indiqué par le cadre rouge.

site-based polymorphism) (265). Ces derniers ont servi à la détection de novo de marqueurs SNP par analyse des températures de dissociation de produit PCR issus de la même amplification chez les deux parents (Figure 42) (protocole en Annexe 4).

3.8.3 Protocole

Le réactif KASPar v4.0 2X Reagent Mix Low Rox (LGC Genomics, KBS-1016-017) est utilisé afin de réaliser le génotypage. Un mix des amorces est réalisé au préalable afin de le rajouter au mix KASPar final. Dans un tube 1,5 mL, 12 μ L de l'amorce spécifique de l'Allèle 1 (100 μ M, 12 μ M final) est mélangé à 12 μ L de l'amorce spécifique de l'Allèle 2 (100 μ M, 12 μ M final) et à 30 μ L de l'amorce commune (100 μ M, 30 μ M final). Enfin 46 μ L d'eau up autoclavée sont rajoutés pour arriver à un volume final de mix d'amorces de 100 μ L. Pour chaque réaction KASPar, le mix final est réalisé en mélangeant 2 μ L d'ADN à 10ng/ μ L, 2 μ L du KASPar v4.0 2X Reagent Mix Low Rox (LGC Genomics, KBS-1016-017) et 0.055 μ L de mix d'amorces.

La PCR pour le génotypage KASPar est réalisée dans une plaque 384 blanche spéciale LightCycler 480 (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white, Roche, référence : 04729749001) selon le programme indiqué en Table 6. Le protocole complet est indiqué en Annexe 5.

3.8.4 Lecture et analyse des résultats

La lecture est effectuée en point final sur le robot LightCycler 480 II (LC480) de Roche par l'intermédiaire du logiciel LightCycler® 480 SW 1.5. L'analyse est effectuée sur le même logiciel et évaluée à la main. Les recombinants sont détectés lorsque le génotype est différent entre les deux SNP étudiés, ce qui veut dire qu'ils proviennent de parents différents et qu'il y a donc eu recombinaison entre les deux marqueurs.



A stylized yellow wheat stalk graphic is positioned diagonally across the page, starting from the bottom left and extending towards the top right. The stalk is composed of a long, pointed leaf at the base and a cluster of wheat heads at the top. The word "RESULTATS" is centered over the middle of the stalk.

RESULTATS

4 RESULTATS

L'objectif de cette thèse était d'évaluer les facteurs essentiels au ciblage de la recombinaison chez le blé tendre afin de l'améliorer et de la diriger vers des zones qui en sont habituellement dépourvues. Pour atteindre cet objectif, il était avant tout nécessaire d'établir une stratégie optimale permettant de produire les résultats dans les temps impartis. Contrairement aux espèces modèles qui disposent d'outils performants (lignées fluorescentes chez *Arabidopsis* par exemple) ou qui ont des temps de génération réduits, la recombinaison chez le blé ne peut être mesurée que sur des descendants d'hybrides. L'intervalle de graine à graine est d'environ six mois. Nous avons donc dû élaborer un protocole adapté concernant la production d'embryons immatures hybrides ce qui constituera la première partie des résultats. La deuxième partie sera consacrée à l'analyse détaillée du gène Spo11-1 chez le blé et qui sert à l'élaboration des constructions destinées au ciblage. La dernière partie présentera enfin les premiers résultats issus des transformations initiales.

4.1 Embryons immatures et Culture *in vitro*

4.1.1 Production des embryons immatures

Nous avons choisi pour la production d'embryons immatures hybrides les variétés Chinese Spring (CS), un blé de printemps référence mondiale pour le séquençage du génome du blé, et Courtot (Ct) un blé d'hiver européen, référence locale pour la transformation par Biolistique du blé tendre. Afin d'éviter toute possibilité d'obtenir des événements de transformation issus de l'autofécondation d'un des deux parents, le croisement n'est effectué que dans un sens, CS en tant que femelle et Ct en tant que mâle. En effet, CS est considéré comme une variété difficilement transformable par biolistique alors que Ct est le génotype de référence utilisé au laboratoire. Ainsi, un individu issu d'une autofécondation CS aura peu de chance d'être transformé. Le taux de

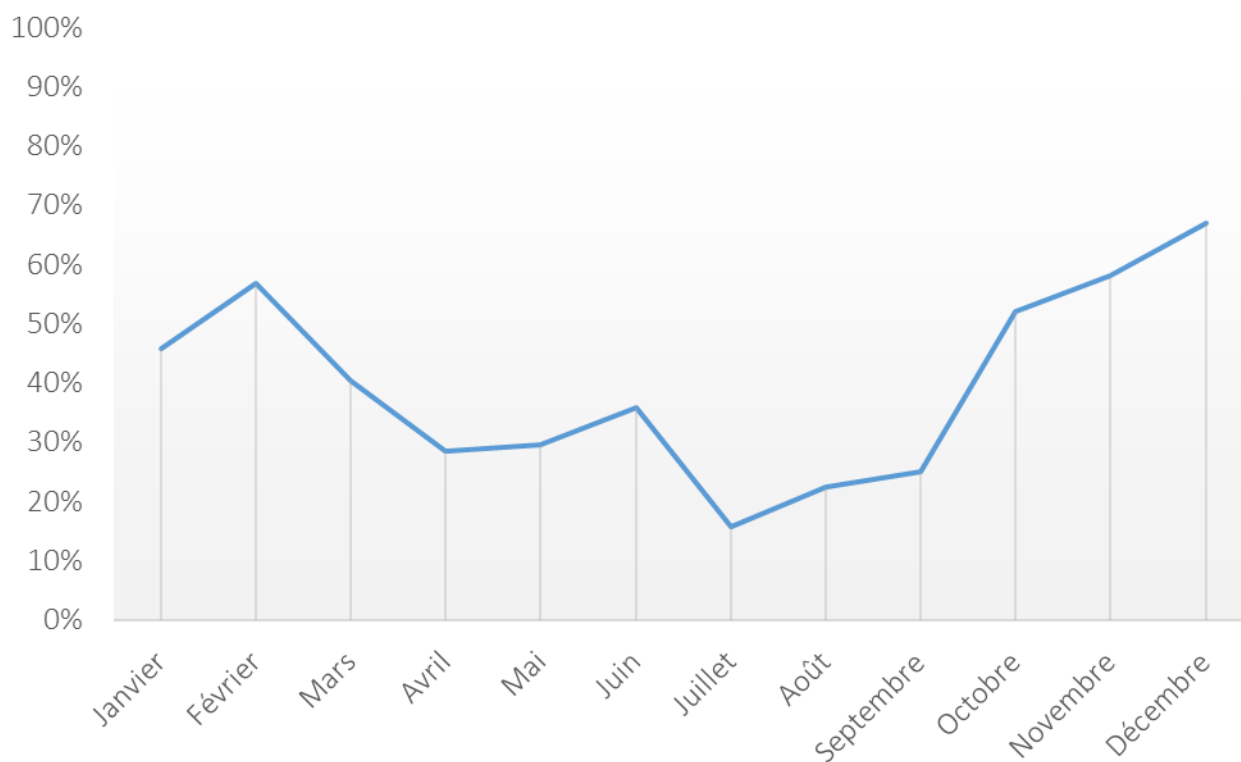


Figure 43 : Pourcentage de réussite au croisement au cours d'une année. Une moyenne de deux croisements par semaines a été réalisée de 2014 à 2018 pendant les campagnes de croisement. Les données de ces campagnes ont été regroupées par mois et le ratio a été calculé en fonction du nombre de fleurs castrées et pollinisées sur le nombre de grains obtenus par mois.

réussite des croisements fluctue grandement suivant la période de l'année, allant de 16% au mois de juillet à 67% au mois de décembre, avec une moyenne de 44% (Figure 43). En prenant en compte tous les croisements effectués entre 2014 et 2018 entre ces deux variétés dans les mêmes conditions climatiques contrôlées, nous observons alors une plus forte obtention de grains immatures dans la période automnale et à la fin de l'hiver/début de printemps. En dehors de ces périodes, le taux d'obtention d'embryons immatures reste relativement bas. Pour optimiser le temps et le coût d'une expérimentation de Biolistique, il apparaît alors que la production d'embryons immatures hybrides doit être améliorée afin d'en avoir un nombre suffisant à transformer en même temps. Etant donné le temps nécessaire pour réaliser un croisement et la faible disponibilité du pollen de Courtot, nous ne pouvions pas augmenter le nombre de croisements réalisés en même temps. C'est ainsi que nous avons décidé d'optimiser leur conservation et notamment en stockant les grains immatures fraîchement récoltés dans des tubes de 50 mL fermés et à 4°C.

4.1.2 Conservation de grains hybrides immatures pour la biolistique

4.1.2.1 Introduction

La transgénèse par biolistique d'embryons immatures est un moyen efficace d'introduire artificiellement de nouveaux gènes dans le blé tendre. Cependant, seuls quelques génotypes peuvent être transformés efficacement. De plus, comme vu précédemment, l'obtention d'une descendance après croisement entre deux variétés de blé tendre peut être aléatoire selon la saison et ne pas être suffisante pour des expériences de biolistique. Dans l'article suivant publié dans la revue PCTOC, j'ai stocké des grains immatures, hybrides ou non, à température ambiante ou à 4 °C pendant 4 ou 7 jours avant de les extraire pour la transformation par biolistique.

4.1.2.2 Cold-conserved hybrid immature embryos for efficient wheat transformation (PCTOC).

(page suivante)



Cold-conserved hybrid immature embryos for efficient wheat transformation

Robin Michard¹ · Manon Batista² · Marie-Claire Debote¹ · Alain Loussert¹ · Caroline Tassy¹ · Pierre Barret¹ · Giacomo Bastianelli³ · Alain Nicolas⁴ · Pierre Sourdille¹

Received: 26 July 2018 / Accepted: 1 November 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract

Transgenesis through biolistic of immature embryos is the most convenient way to introduce artificially new genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). However, only a few genotypes can be efficiently transformed. To improve the transformation of wheat varieties, we stored immature seeds at room temperature or 4 °C during 4 or 7 days and extracted immature embryos prior to transformation. Shelling stops the embryo's growth and almost all the embryos formed a callus on selective media when stored at 4 °C for 4 or 7 days (respectively 87% and 99%). We also used hybrid immature embryos derived from a cross between a transformable line (Courtot) and a non-transformable line (Chinese Spring) for biolistic transformation. Hybrid embryos showed the same response to biolistic than the responsive parent. All together, these results improve significantly the biolistic protocol for wheat transformation by reducing the number of mother plants in the greenhouse, and improve the transformation of additional genotypes through hybrid transformation.

Keywords Wheat · Cold treatment · Hybrids · Transformation · Biolistic

Communicated by Francisco de Assis Alves Mourão Filho.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1521-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Robin Michard
robin.michard@inra.fr

✉ Pierre Sourdille
pierre.sourdille@inra.fr

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Université Clermont Auvergne, Unité Mixte de Recherche 1095 Génétique Diversité Écophysiologie des Céréales, 5 chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France

² Centre de Biologie Intégrative, CNRS UMR 5100 Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, Université Toulouse III Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

³ SAS Meigenix France, 38 rue Servan, 75011 Paris, France

⁴ Institut Curie, CNRS UMR 3244, PSL Research University, Université Pierre et Marie Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

Introduction

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.; $2n=6x=42$; AABBDD) is one of the most cultivated crops in the world and represents almost 20% of protein sources for human nutrition (FAO STAT). To face the increase in world population, the improvement of bread wheat performances is a major agricultural challenge, especially within the context of sustainable agriculture with reduced uses of fertilizers, water and pesticides. One way to face this challenge is to use the huge reservoir of the exotic or related genetic resources to find new original and powerful alleles for the genes of agronomical interest. These new alleles can then be introduced into elite material through classical crosses and recombination between the appropriate segments of the genome. However, the frequency of meiotic recombination in wheat is low (average 0.2 cM/Mb; Choulet et al. 2014) and almost restricted to ~20% of the distal regions of the chromosomes (Saintenac et al. 2009; Darrier et al. 2017). As a consequence, low recombination rate results in massive undesirable linkage drag, if ones wish to introduce, in elite material, the desirable new alleles originating from exotic cultivars or wild species. To avoid this drawback, new alleles can be introduced through genetic transformation and/or

genome-editing biotechnologies (Jones 2005; Wang et al. 2014; Zong et al. 2017; Kim et al. 2018; Liang et al. 2018; Sánchez-León et al. 2018).

Agrobacterium mediated transformation (Cheng et al. 1997; Carlos Popelka and Altpeter 2003; Przetakiewicz et al. 2004) and Biolistic® (Vasil et al. 1992; Wang et al. 2014) are successfully used for transformation of a wide range of European (Rasco-Gaunt et al. 2001) and Chinese (Zhang et al. 2015) elite varieties. The performance of Biolistic (or particle bombardment) mainly limited by the lack of plant regeneration depends on several factors: particle type, size, quantity and projection speed, the amount, structure and quality of DNA but also on the tissue type and pretreatment (for review see Altpeter et al. 2016). Traditionally, tissues with totipotent cells (callus, somatic embryos, etc.) and treated with growth regulators (auxins and cytokinins) are best transformed. Stresses of different nature (dark, protoplasting) also seems to play an important role in plant regeneration (Florentin et al. 2013; Fehér 2015; Grafi and Barak 2015).

Even though biolistic has been improved and made flexible, some wheat genotypes remain difficult to transform (recalcitrant) whereas others are responsive (Shrawat and Lörz 2006; Hiei et al. 2014). For example, the reference cultivar for in vitro culture, Bobwhite, has a transformation efficiency ranging from 2.5 to 3–6% (Tassy et al. 2014) while Courtot, a French winter wheat that is responsive to biolistic, has a transformation efficiency of only 1.47% (49 transformed plants over 3326 shooted immature embryos, Tassy and Barret 2017). Chinese Spring, a spring wheat used as a reference cultivar for genome sequencing (Choulet et al. 2014; International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) 2014; International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) 2018) is a recalcitrant genotype for biolistic that cannot be transformed (0 transformed plants over at least 3000 shooted immature embryos; our unpublished results). On the contrary, Chinese Spring is considered to have a high regeneration efficiency when not submitted to biolistic (Machii et al. 1998).

Since fertile transgenic wheat plants regenerate only from a few target cell-types, the choice of the explant for genetic transformation is a critical step. Three types of tissues are usually used for transgenic plant production: immature inflorescence and scutellum of mature or immature zygotic embryos. Quality of mature embryos depends on the maturation conditions of the plant. Stresses such as drought, heat chock or pathogen aggression during maturation of the seed can lead to weak embryos (Samarah 2005) and to regeneration failures. Furthermore, extraction of mature embryos is quite difficult because they adhere to the endosperm and external seed layers, which results in their deterioration while removing them from the seeds whereas immature embryos are free inside the immature seed so they can be

removed easily. However, transformation efficiency between mature and immature embryos fluctuate between wheat genotypes (Özgen et al. 1998).

In wheat, production of hybrid immature embryos is tedious and encounters a problem of synchronization (material impossibility to obtain enough embryos at the right stage at the same time to achieve the genetic transformation). There is a short period of optimal collection (around 14 days after pollination, dap; Pastori et al. 2001; Tassy et al. 2014) and it is an arduous task to harvest enough immature embryos at the right stage (around 1 mm long) for transformation. Moreover, we experienced fluctuation in the success rate of crosses and found that production of a required amount of seed can represent three times the amount of work expected (Online Resource 1). Li et al. (2003) used cold temperature (4 °C) to store immature spike collected few days (10–16) post anthesis to enhanced somatic embryogenesis. Cold was usually used for vernalization of winter crops such as winter wheats and it reduces or even stops plant growth and induces its flowering (Dennis and Peacock 2009). Li et al. (2003) also suggested that a long period of cold storage of spikes is necessary for efficient somatic embryogenesis.

In the present study, we report the possibility of stopping embryo growth by shelling and keeping immature seeds at cold temperature (4 °C) for a few days (4–7 days), and show that the transformation rate obtained for a hybrid line is similar to that of the most responsive parent.

Materials and methods

An add-on to this section is given in Online Resource 2.

Plant culture and embryo production

Three bread wheat genotypes were used for this experiment: Bobwhite (BW; cultivar BWS26), Chinese Spring (CS) and Courtot (Ct). Donor plants of immature embryos were grown in a dedicated greenhouse under controlled climatic conditions with a 16 h/8h and 22 °C/18 °C day/night cycle. The resulting T0 (original transgenic generation) transgenic plants were cultivated in a dedicated GMO greenhouse under the same conditions. Hybrid seeds were produced using Ct as male and CS as female. As many flowers as possible per spike were emasculated and fertilized with Ct fresh pollen 2–3 days after castration. Around eight spikes a day, 3 days a week were emasculated, to match Ct pollen availability.

Cold conservation and embryo measurement

At 11–12 days after pollination, depending on the culture conditions, we harvested immature seeds (IS) and sterilized them in 70% ethanol for 1 min. Then the IS are rinsed with

autoclaved pure water and allowed to dry on sterile absorbent paper. We stored the sterilized IS in a 50 mL plastic tube either at 4 °C in a cold chamber or on the bench at room temperature (RT). For measurement, immature embryos (IE) are extracted from IS and placed on plasmolysis medium (Tassy et al. 2014). To measure the IE sizes, a picture of each set of IE is taken on millimeter paper using a stereomicroscope. Each picture is analyzed with the imageJ Measure tool (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146.html>, subsection 30.1) to determine IE sizes that are given in pixels and translated into millimeters using the references on the millimeter paper.

Preparation of immature embryos (IE) or hybrid immature embryos (HIE), shooting and in vitro culture

Preparation of IE (or HIE) and shooting are performed as described in Tassy et al. (2014). IE (or HIE) were extracted and their radicula removed. IE (or HIE) prepared according to the Tassy et al. (2014) protocol are thereafter still designated as IE (or HIE). Some modifications were made to the Tassy et al. (2014) shooting protocol: for 10 shootings, 200–250 ng of DNA were coated to gold micro particles. In case of co-transformation with two DNA fragments, both fragments are added in equimolar ratio according to the size of each fragment. DNA fragments for shooting were prepared as described in Tassy et al. (2014), using gene cassettes (Breitler et al. 2002; Yao et al. 2007). In vitro culture was performed as described in Tassy et al. (2014), on Phospho-Mannose Isomerase (PMI) selective media (Fig. 1, Wright et al. 2001; Stoykova and Stoeva-Popova 2011). Briefly, after one night at 30 °C, freshly transformed IE (or HIE) are put on callogenesis medium for 2 weeks. Generated calli are transferred to two consecutive selective media for organogenesis (leaves) for 2 weeks each. The second medium is less selective than the first one to let the regenerating plantlets grow properly. Regenerated plantlets are then transferred to a third selective medium for final selection of transformed ones. This step avoids escape events (plants that survive selection but that are not transformed). In the end, after 2 weeks, plantlets selected on the third medium are transferred to a fourth selective medium for root organogenesis. Once the plantlets have developed roots and leaves in sterile IVC containers, each of them are transferred individually in small pots with germination soil and placed in an acclimation cabinet for 2 weeks with a 16 h/8 h and 22 °C/18 °C day/night cycle and 60% of moisture, awaiting for PCR analysis.

Analysis of transgenic plants

Transgenic plant DNA was extracted using Oktopure automated DNA extraction system and sbeadex™ plant DNA extraction kit (LGC Limited©). Transgenic plants were detected by PCR using specific primers for the DNA fragments inserted and Amplitaq Gold® 360 Master Mix and protocol (Applied Biosystems™). Transformation was assessed by PCR on transgene (here PMI gene with primers PMI1 and PMI2, Online Resource 3) with, if possible, a maximum of three leaves samples from three different stems of the same plant. To avoid chimeras, plants were considered as transformed when all samples of the same plant are positive to PCR. Microsatellite specific primers were used on each sample (WMS257, Online Resource 3) as a PCR control. Melting temperatures are specified in Online Resource 3.

Calculations and statistics

Regeneration and transformation rates were determined using the initial number of embryos and the final numbers of respectively regenerated and transformed plants. To generate the violin plots for embryo sizes repartition, R ggplot function was used in association with geom_violin and geom_boxplot functions from R package ggplot2. To assess the significance between the results obtained and the control, R wilcox.test function (for embryo size repartitions comparison) and R t-test function (for regeneration capacity comparison) were applied with a threshold of $\alpha=0.05$. R software (version 3.4.3) was exploited with Rstudio (version 1.1.423).

Results

Shelling stops the growth of the IE and cold storage preserves its embryogenetic capacity

To analyze the impact of shelling and cold storage on wheat IE, we collected 796 IS at 11 days after pollination from thirty different spikes of BW, each IS giving one IE. IS from ten spikes were attributed to the control set (BW0, 192 IS). IS from the twenty spikes left were divided into four test sets (IS from five spikes each). To test the impact of shelling, two sets were kept at RT during 4 days (155 IS, BW4RT) and 7 days (161 IS, BW7RT). We then extracted the IE of each IS and measured their size, in comparison to BW0's IE extracted right after collection as described in "Materials and methods" (Fig. 2). After 4 days at RT (BW4RT), the mean size of the IE (0.85 ± 0.19 cm) was not significantly different from the control (BW0: 0.89 ± 0.22 mm; p-value = 0.06676). On the contrary, after 7 days at RT (BW7RT), the mean size

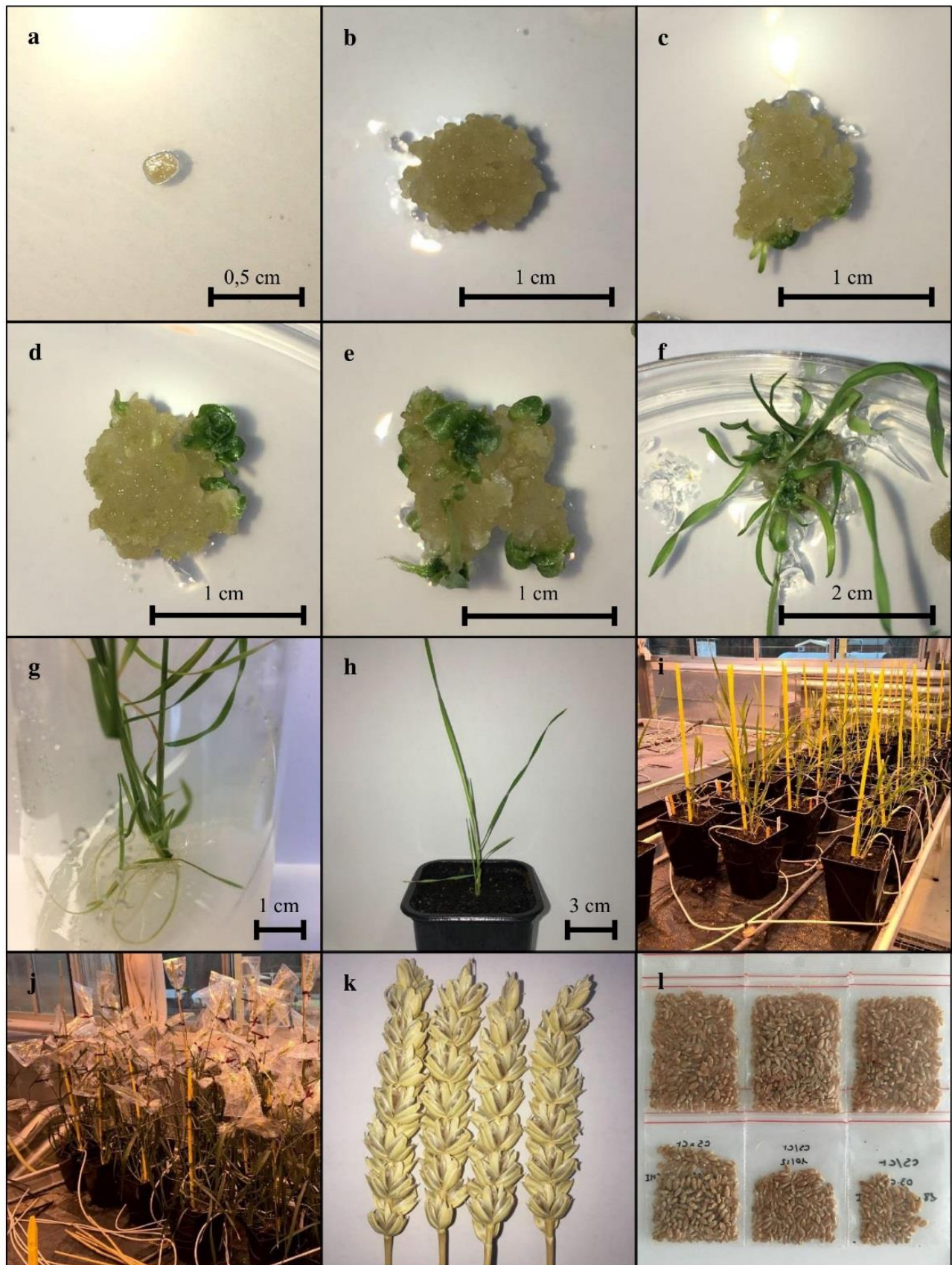


Fig. 1 IVC steps following biolistic protocol from IE (or HIE) to T1 (original transgenic generation's first progeny) seeds. **a** Embryos just after transformation. **b** Callogenesis step. **c** First organogenesis step (leaves) on the first selective medium. **d, e** Leaf development on the second selective medium. **d, e** Leaf development on the second selective medium. **f** Leaf development on the third selective medium. **g** Second organogenesis step (roots) and leaf development just before transfer to greenhouse. **h** Plantlets transferred in small pots in acclimation chamber. At this stage, plantlets are not big enough for DNA sampling (PCR analysis). 1 or 2 weeks are needed to allow the plant to grow in acclimation chamber. **i** After 2 weeks in acclimation chamber (with additional 2 months at 6 °C for winter genotypes only), T0 transgenic plants (positives to PCR) are transferred to 4L pots with cultivation soil in a dedicated place. **j** Flowering T0 transgenic plants. Each spike is isolated in a moisture permeable plastic bag for auto-pollination. **k** Fully fertile T0 transgenic spikes. **l** T1 seeds collected from T0 transgenic spikes, each plastic bag represent T1 seeds collected from one T0 transgenic plant

of the IE was 0.77 ± 0.15 mm, significantly lower than the control (p -value = $1.921e-08$). Then, to test the impact of cold storage, we conducted the same experiment on the other two sets by storing the IS at 4 °C for 4 and 7 days (BW4C, BW7C) and the mean size of the IE was 0.87 ± 0.15 mm and 0.92 ± 0.17 mm, respectively. This is not significantly different from the control (BW0 0.89 ± 0.22 mm; p -value = 0.4496 and 0.1804, respectively).

Next, to test the embryogenic capacity and the transformability of the IE stored at RT or 4 °C, we conducted a transformation experiment for the PMI gene on the previous five IE sets with Biolistic® and placed them on successive mannose selective media (Tassy et al. 2014). For the control set, 0% of the IE aborted, 100% formed a callus, 9% generated a plantlet and 4% generated a transformed plantlet (Fig. 3). In contrast, for RT-stored sets, we observed that 76% and 100%

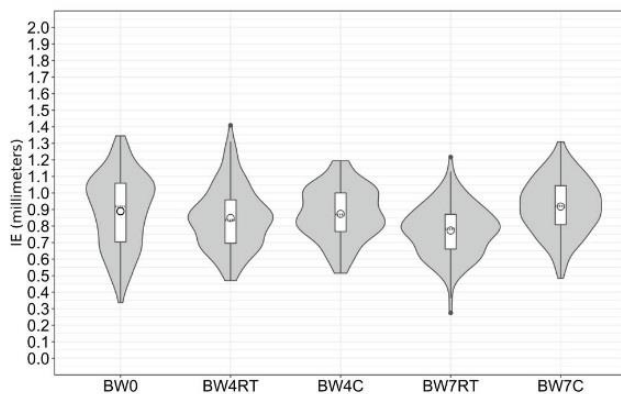


Fig. 2 Distribution of Bobwhite (BW) IE sizes in millimeters for IE stored at RT for 4 and 7 days (BW4RT and BW7RT) and at 4 °C (C) during 4 or 7 days after collection (BW4C, BW7C). BW0 is the control. BW IE were extracted from IS and then measured as described in “Materials and methods”. Violin plots: distribution of all embryo sizes for each set. Boxplots: white boxes: lower and upper quartile for each set, dashed lines: Median size of embryos for each set, circles: mean size of embryos for each set, black dots: outliers

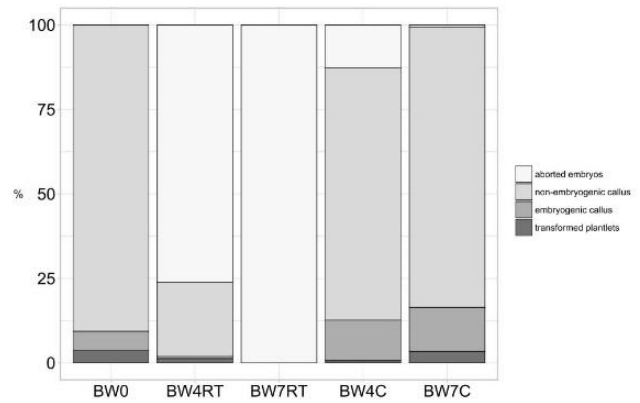


Fig. 3 Regeneration capacity and transformability of embryos kept at RT during 4 or 7 days after collection (BW4RT and BW7RT) and at 4 °C during 4 or 7 days after collection (BW4C, BW7C). BW0 is the control. White: aborted embryos (IE that did not form a callus on the cell multiplication media). Light grey: non-embryogenic callus (IE that formed a callus on selective media but that did not generate a plantlet). Grey: embryogenic callus (IE that formed a callus and generated a plantlet). Dark grey: transformed plantlets (plantlets generated from embryogenic callus and positives to PMI PCR)

of the IE aborted after 4 and 7 days, respectively. Only 2% of the total IE generated a plantlet after 4 days at RT, which is significantly lower than the control (p -value = 0.002, $\alpha = 0.05$) and 1% of the total embryos generated a plantlet that were transformed with PMI gene, which is not significantly different from control (p -value = 0.15, $\alpha = 0.05$). However, callus that formed a plantlet represents 8% of the callus formed after 4 days at RT, which is not significantly different from the control (p -value = 0.80, $\alpha = 0.05$) and callus that formed a transformed plantlet represents 5% of the callus formed after 4 days at RT, which is not significantly different from the control (p -value = 0.66, $\alpha = 0.05$). We then observed that after 4 or 7 days at 4 °C, respectively 87% and 99% of the embryos formed a callus and respectively 13% and 16% of the callus generated a plantlet, which is not significantly different from the control (p -value = 0.35 and 0.06, respectively, $\alpha = 0.05$). Callus that generated a transformed plantlet for BW4C et BW7C represent 1% and 3% of the total embryo set, which is not significantly different from the control (p -value = 0.06 and 0.91, $\alpha = 0.05$).

The number of embryos that formed a callus and further developed a plantlet represents respectively 15% and 17% of the callus formed for BW4C and BW7C, which is not significantly different from the control (p -value = 0.18 and 0.06, respectively, $\alpha = 0.05$). Then the number of embryos that formed a callus and further developed a transformed plantlet represents respectively 1% and 4% of the callus formed for BW4C and BW7C, which is not significantly different from the control (p -value = 0.07 and 0.92, respectively, $\alpha = 0.05$).

Table 1 Transformation efficiency of Ct and CS/Ct hybrids

Set of embryos	Number of embryos shooted	PCR-validated trans-formed plants at the end of in vitro culture	Hybrid transformation efficiency (%)	Ct transformation efficiency (%)	P-value
1	535	10	1.9	1.5	0.5248
2	615	14	2.3	1.5	0.2078
3	1901	29	1.5	1.5	0.8814

Embryos were at least stored 3 days at 4 °C before shooting. P-value were obtained with t-test function on R (version 3.4.3)

Hybrid embryos transform as the best transformable parent

We performed Biolistic transformation as described in “[Materials and methods](#)” using HIE derived from the cross between Chinese Spring (CS female) and Courtot (Ct male; CS × Ct) kept at 4 °C for 3–5 days. Ct and CS exhibit a transformation efficiency of 1.5% (Tassy and Barret 2017) and 0% (our unpublished results), respectively. For the first set of 535 HIE, we obtained 10 PCR-validated transformed plants. For the second and the third sets of 615 and 1901 HIE respectively, we obtained 14 and 29 PCR validated transformed plants, respectively. This represents 1.9%, 2.3% and 1.5%, for HIE sets 1, 2 and 3, respectively. This is not significantly different from the results obtained with Ct alone (Table 1), indicating that the transformation efficiency of Ct is dominant compared to that of CS. Fertility level of resulting transgenic plants is normal with a mean of 18 ± 5 seeds per spike (on 7 independent transformation events).

Discussion

The construction of transgenic plants is a valuable approach for candidate gene validation and genome editing but is limited by two main factors: the transformation efficiency that remains relatively low and genotype dependent (<5% for the best genotypes; Tassy et al. 2014), and the availability of sufficient amount of appropriate material (here, IE).

Shelling stops the growth of the embryos

Here, we observed no difference between sizes of the fresh IE and those stored at RT for 4 days or kept at 4 °C for 4 or 7 days. Thus, our results are in accordance with data obtained in carrot (*Daucus carota* L.; Geard et al. 2007), where the maximum seed size is achieved 40–60 days after

full blooming while embryo development continues up 30–50 days after. The results suggested that early shelling blocks the development of embryos in carrot leading to poor seed quality. However, the embryos kept at RT for 7 days are significantly smaller than fresh embryos. Between 10 and 15 days post anthesis, the embryo is in an exponential growth phase (Golovina et al. 2001; Fábíán et al. 2011) with a growth of 0.5 mm per day. In wheat, the difference between the control and BW7RT is of 0.08 mm, representing approximately 4 h during the exponential growth phase. BW7RT may have been sampled earlier than the control BW0, regarding the days post-anthesis, and this may justify the small difference in size.

Cold storage preserves embryogenetic capacity of immature embryos

Previous studies described the positive effect of cold treatment on somatic embryogenesis in Maize (*Zea mays*, Pescitelli et al. 1990), Oat (*Avena sativa*, Kiviharju and Pehu 1998), Prairie Milkvetch (*Astragalus adsurgens*, Luo et al. 2003), Patula Pine (*Pinus patula*, Malabadi and Staden 2006), Oilseed Rape (*Brassica napus*, Gu et al. 2004), and Monterey Pine (*Pinus radiata*, Montalbán et al. 2015). In bread wheat (*Triticum aestivum* L.), the storage of spikes collected 11–12 days post anthesis (DPA) during 13 to 16 days at 4 °C was found to significantly affect the percentage of embryo’s scutella producing somatic embryos (Li et al. 2003). They reported that a long period of spike storage at 4 °C is necessary for efficient somatic embryogenesis. In our experiments, we see any significant difference neither in regeneration efficiency nor in transformability compared to the control and we found no effect of short cold-storage period on somatic embryogenesis. This is in total accordance with their results, as we did not perform a long period of storage at 4 °C.

On the contrary, storage at RT abolishes callus formation upon 7 days conservation. Lublin and Sela (2008) showed that when stored at RT, pathogens present at the surface of an egg are capable of multiplication to large numbers. However, at low temperature (6 °C), even if the pathogen can survive up to 6 weeks, it is not able to multiply and infect the egg. Nevertheless, we performed only a surface treatment on the IS and bacteria could have been introduced inside the IS through stinging insects (*Thysanoptera*, Bailey 1935). As bacterial infection is likely to happen at RT, IS stored at RT can develop internal bacterial infection affecting the IE, making it unsuitable for genetic transformation. In contrast, cold storage is likely to reduce bacterial spreading, preventing infection of the IE and preserving its integrity and embryogenic ability.

Hybrid transformation

Like in maize (Hodges et al. 1986), we found that wheat hybrid embryos derived from a cross between Chinese Spring (recalcitrant parent) and Courtot (responsive parent) retain an equivalent embryogenic capacity than the embryos of the best transformable parent. It could be due to the heterosis effect (Birchler et al. 2010) but as we found no evidence of a such mechanism in in vitro tissue cultures, we conclude that the transformation capacity could be a heritable trait dominant in Courtot compared to Chinese Spring. Transformability and more generally tissue-culture response is a trait that is genetically controlled and several QTLs have been identified (Amer et al. 1997; Bolibok and Rakoczy-Trojanowska 2006; Jia et al. 2007). Gene transfer in wheat has also long been limited to highly responsive genotypes such as Bobwhite and Florida, selected for their good response in tissue culture and amenability to transformation. However, transformation of elite breeding lines remains difficult, mainly ranging between 1–5% (Rasco-Gaunt et al. 2001; Tassy et al. 2014). Only a few elite genotypes (15%) exhibited percentages of ~6–8% (Rasco-Gaunt et al. 2001) slightly higher than the reference cultivar Bobwhite (~3–5%; Tassy et al. 2014).

Conclusion

Here we reported that shelling associated to cold conservation provides the possibility to store multiple sets of IS up to 7 days while keeping the optimal embryogenic ability of the IE until transformation. This reduces the number of plants that is necessary to cultivate and so the cost of a transformation experiment. We also showed that the best transformation capacity of a parental line is retain in hybrid embryos. Altogether, these results optimize the wheat biolistic protocol for genome engineering and transgenic applications.

Acknowledgements Members of the team CPCC are greatly acknowledged for taking care of the plants. Members of the team ValFon are also acknowledged for helpful discussions and for providing with all facilities for biolistic transformation. RM is funded by ANRT CIFRE Grant No. 2014/1020.

Author contributions RM, CT, MCD, AL and MB conducted the experiments; RM analyzed all data; RM, PB and PS conceived this work and wrote the paper. GB and AN reviewed the paper. All authors contributed in the writing of this paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Altpeter F, Springer NM, Bartley LE et al (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell* 28:1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Amer IB, Worland AJ, Korzun V, Börner A (1997) Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. *TAG Theor Appl Genet* 94:1047–1052. <https://doi.org/10.1007/s001220050513>
- Bailey SF (1935) Thrips as vectors of plant disease. *J Econ Entomol* 28:856–863. <https://doi.org/10.1093/jec/28.6.856>
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S et al (2010) Heterosis. *Plant Cell* 22:2105–2112. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076133>
- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M (2006) Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants. *Euphytica* 149:73–83. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-9055-6>
- Breitler J-C, Labeyrie A, Meynard D et al (2002) Efficient micro-projectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. *TAG Theor Appl Genet* 104:709–719. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0786-z>
- Carlos Popelka J, Altpeter F (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L.). *Mol Breed* 11:203–211. <https://doi.org/10.1023/A:1022876318276>
- Cheng M, Fry JE, Pang S et al (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971–980. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.971>
- Choulet F, Alberti A, Theil S et al (2014) Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345:1249721. <https://doi.org/10.1126/science.1249721>
- Darrier B, Rimbart H, Balfourier F et al (2017) High-resolution mapping of crossover events in the hexaploid wheat genome suggests a universal recombination mechanism. *Genetics* 206:1373–1388. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.196014>
- Dennis ES, Peacock WJ (2009) Vernalization in cereals. *J Biol* 8:57. <https://doi.org/10.1186/jbiol156>
- Fábián A, Jäger K, Rakszegi M, Barnabás B (2011) Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Rep* 30:551–563. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0966-x>
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta* 1849:385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Florentin A, Damri M, Grafi G (2013) Stress induces plant somatic cells to acquire some features of stem cells accompanied by selective chromatin reorganization. *Dev Dyn* 242:1121–1133. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24003>
- Geard A, Spurr CJ, Brown PH (2007) Embryo development and time of cutting in cool temperate carrot seed crops. In: Adkins SW, Ashmore S, Navie SC (eds) *Seeds: biology, development and ecology*. Proceedings of the eighth international workshop on seeds. CABI, Wallingford, pp 120–129
- Golovina EA, Hoekstra FA, Van Aelst AC (2001) The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. *J Exp Bot* 52:1015–1027. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1015>
- Grafi G, Barak S (2015) Stress induces cell dedifferentiation in plants. *Biochim Biophys Acta* 1849:378–384. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.015>
- Gu HH, Hagberg P, Zhou WJ (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regul* 42:137–143. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000017488.29181.fa>

- Hiei Y, Ishida Y, Komari T (2014) Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Front Plant Sci 5:628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Nat Biotechnol 4:219–223. <https://doi.org/10.1038/nbt0386-219>
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. Science 345:1251788. <https://doi.org/10.1126/science.1251788>
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science 361:7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Jia H, Yi D, Yu J et al (2007) Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. Mol Cells 23:323–330
- Jones HD (2005) Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. J Cereal Sci 41:137–147. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.08.009>
- Kim D, Alptekin B, Budak H (2018) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. Funct Integr Genomics 18:31–41. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
- Kiviharju E, Pehu E (1998) The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell Tissue Organ Cult 54:97–104. <https://doi.org/10.1023/A:1006167306638>
- Li B, Caswell K, Leung N, Chibbar RN (2003) Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: days post anthesis, days of spike storage, and sucrose concentration affect efficiency. In Vitro Cell Dev Biol 39:20–23. <https://doi.org/10.1079/IVP2002356>
- Liang Z, Chen K, Zhang Y et al (2018) Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. Nat Protoc 13:413–430. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.145>
- Lublin A, Sela S (2008) The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars enteritidis and virchow in the eggs. Poult Sci 87:2208–2214. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00153>
- Luo J, Jiang S, Pan L (2003) Cold-enhanced somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with exogenous calcium during cold pretreatment. Plant Growth Regul 40:171–177. <https://doi.org/10.1023/A:1024295901808>
- Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T et al (1998) Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult 53:67–74. <https://doi.org/10.1023/A:1006023725640>
- Malabadi RB, van Staden J (2006) Cold-enhanced somatic embryogenesis in *Pinus patula* is mediated by calcium. S Afr J Bot 72:613–618. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2006.04.001>
- Montalbán IA, García-Mendiguren O, Goicoa T et al (2015) Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. New Forest 46:309–317. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9457-1>
- Özgen M, Türet M, Altunok S, Sancak C (1998) Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Rep 18:331–335. <https://doi.org/10.1007/s002990050581>
- Pastori GM, Wilkinson MD, Steele SH et al (2001) Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. J Exp Bot 52:857–863. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.857>
- Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990) Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. Plant Cell Rep 8:628–631. <https://doi.org/10.1007/BF00270070>
- Przetakiewicz A, Karaś A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2004) Agrobacterium-mediated transformation of polyploid cereals. The efficiency of selection and transgene expression in wheat. Cell Mol Biol Lett 9:903–917
- Rasco-Gaunt S, Riley A, Cannell M et al (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. J Exp Bot 52:865–874. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.865>
- Saintenac C, Falque M, Martin OC et al (2009) Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetics 181:393–403. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.097469>
- Samarah NH (2005) Effects of drought stress on growth and yield of barley. Agron Sustain Dev 25:145–149. <https://doi.org/10.1051/agro:2004064>
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV et al (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant Biotechnol J 16:902–910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
- Shrawat AK, Lörz H (2006) Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. Plant Biotechnol J 4:575–603. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00209.x>
- Stoykova P, Stoeva-Popova P (2011) PMI (manA) as a nonantibiotic selectable marker gene in plant biotechnology. Plant Cell Tissue Organ Cult 105:141–148. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9858-6>
- Tassy C, Barret P (2017) Biolistic transformation of wheat. In: Bhalla P, Singh M (eds) Wheat biotechnology. Methods in molecular biology, vol 1679. Humana Press, New York, pp 141–152
- Tassy C, Partier A, Beckert M et al (2014) Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression. Plant Cell Tissue Organ Cult 119:171–181. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0524-2>
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Nat Biotechnol 10:667–674. <https://doi.org/10.1038/nbt0692-667>
- Wang Y, Cheng X, Shan Q et al (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat Biotechnol 32:947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Wright M, Dawson J, Dunder E et al (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. Plant Cell Rep 20:429–436. <https://doi.org/10.1007/s002990100318>
- Yao Q, Cong L, He G et al (2007) Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. Mol Biol Rep 34:61–67. <https://doi.org/10.1007/s11033-006-9016-8>
- Zhang K, Liu J, Zhang Y et al (2015) Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. J Genet Genomics 42:39–42. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.11.005>
- Zong Y, Wang Y, Li C et al (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nat Biotechnol 35:438–440. <https://doi.org/10.1038/nbt.3811>

4.1.2.3 Principales conclusions

Le fait de séparer le grain immature de l'épi stoppe la croissance de l'embryon et presque tous les embryons soumis à ce traitement forment un cal sur un milieu sélectif lorsqu'ils sont conservés à 4 ° C pendant 4 ou 7 jours (respectivement 87% et 99%). Nous avons également utilisé des embryons hybrides immatures issus d'un croisement entre une lignée transformable (Courtot) et une lignée non transformable (Chinese Spring) pour la transformation biolistique. Les embryons hybrides conservent la même transformabilité que le parent répondant le mieux à la biolistique. Dans l'ensemble, ces résultats améliorent considérablement le protocole biolistique de transformation du blé en réduisant le nombre de plantes mères en serre et améliorent la transformation de génotypes supplémentaires par le biais d'une transformation hybride. Enfin, le fait de pouvoir transformer des hybrides permet d'envisager un gain de temps substantiel pour la suite du projet.

4.1.3 Résultats de la transformation des embryons immatures et plantes T0

Les résultats des transformations ont été assez variables suivant les épisodes de transformation, mais dans l'ensemble le taux de transformation reste assez stable, autour de 0,7%. Sur 21910 embryons transformés au total, 159 plantes ont été générées dont 71 sont transgéniques pour la construction SpiX. Le taux de plantes positives pour le gène de sélection PMI est en moyenne 30% supérieur au taux de plantes positives pour la construction SpiX. Ceci est dû au fait que les deux constructions sont utilisées en co-bombardement, donc indépendante l'une de l'autre, et que la probabilité théorique de retrouver à la fois l'une et l'autre de ces constructions insérées dans le génome de l'embryon transformé est de 30%.



Figure 44 : Semences T1 collectées à partir d'épis transgéniques T0. Les grains sont placés dans des sachets en plastique représentant chacun une plante transgénique T0. Les sachets sont placés en chambre de stockage à une température de 7°C pour la levée de dormance.

Les plantes transformées ont une croissance tout à fait normale, l'étape critique étant située essentiellement au niveau de la culture *in vitro* et plus précisément lors de la sélection sur le milieu PMI3 et MSOPMI. En effet, une tendance à perdre la majorité des plantes sélectionnées sur les milieux PMI1 et PMI2 a été remarquée.

Une fois en serre, celles-ci conservent un rythme de croissance normale et présentent toutes le même phénotype, confirmant ainsi l'hybridation entre CS et Ct (Figure 38). La plante conserve la taille moyenne des plantes de CS et présente des épis barbus, caractéristiques de Ct. La floraison a lieu normalement au bout de six semaines suivant la sortie de vernalisation, néanmoins quelques plantes fleurissent jusqu'à une semaine en avance. Le nombre moyen d'épis est de 10 par plante et les cas de stérilité sont marginaux (2%). Le rendement est stable avec en moyenne 20 grains par épis, mais la quantité de grain étant fonction du nombre d'épis, la récolte varie fortement d'une plante à l'autre (Figure 44). Ce matériel sera utilisé ultérieurement pour l'analyse des variations du taux de recombinaison (voir chapitre 4.4.2).

4.2 Les orthologues de SPO11 chez le blé tendre

La technologie SpiX est composée à la fois d'un domaine de liaison à l'ADN et de la protéine SPO11, essentielle pour la génération de cassures double-brins de l'ADN, catalysant l'apparition de point de recombinaison méiotique. Chez les plantes il existe au minimum trois versions du gène Spo11 (Spo11-1, Spo11-2 et Spo11-3) dont les deux premières sont impliquées directement en duplex dans l'apparition des cassures double-brins. Au début du projet il a été décidé d'utiliser séparément les versions 1 et 2 de Spo11 couplées au domaine de liaison à l'ADN afin de maximiser les chances d'induire des CDB. Dans ce même souci d'optimisation, les introns 1 et 2 ont été gardés dans les deux gènes, car chez la levure des domaines de régulation pré-transcriptionnelle y sont présents. Cependant chez le blé tendre, cette information n'est pas connue. Pour ce faire, il a fallu dans un premier temps identifier et isoler les portions de génome portant potentiellement les deux gènes et ensuite déterminer finement les bornes de ceux-ci ainsi que les parties exoniques et introniques

4.2.1 Détermination des CDS et protéines

En suivant le protocole de recherche de gènes décrit en M&M, six contigs (portion de séquence génomique reconstituée à partir de données de séquençage, Annexe 6) ont été isolés, trois portant une des copies homéologues du gène Spo11-1 et trois autres portant chacun une des trois copies homéologue du gène Spo11-2. Les contigs correspondant au gène Spo11-1 sont issus du bras long des chromosomes du groupe 5 (5AL, 5BL et 5DL) et ceux correspondant au gène Spo11-2 sont issus du bras long des chromosomes du groupe 7 (7AL, 7BL et 7DL). Les séquences génomiques ainsi isolées ont été alignées manuellement sur la version génomique et le CDS des gènes orthologues de Spo11-1 et Spo11-2 de *Brachipodium distachyon*. Afin d'obtenir un CDS viable

Table 7 : Les gènes Spo11 de blé tendre, leur localisation et leur taille.

Gène	Chromosome	ID du gènes	numéro du transcrit	Taille génomique (pb)	Taille CDS (pb)	ID protéine	Taille (aa)
Spo11-1-5A	5A	TraesCS5A02G391400	1	3937	1164	A0A3B6KM14	387
Spo11-1-5B	5B	TraesCS5B02G396300	1	3928	1161	A0A3B6LTD1	386
Spo11-1-5D	5D	TraesCS5D02G401100	1	3970	1164	A0A3B6MY04	387
Spo11-2-7A	7A	TraesCS7A02G300300	1	2874	1080	A0A3B6RJZ0	359
Spo11-2-7B	7B	TraesCS7B02G201200	1	2982	1161	A0A3B6SFG9	386
Spo11-2-7D	7D	TraesCS7D02G296000	2	2880	1161	A0A3B6TSG3	386

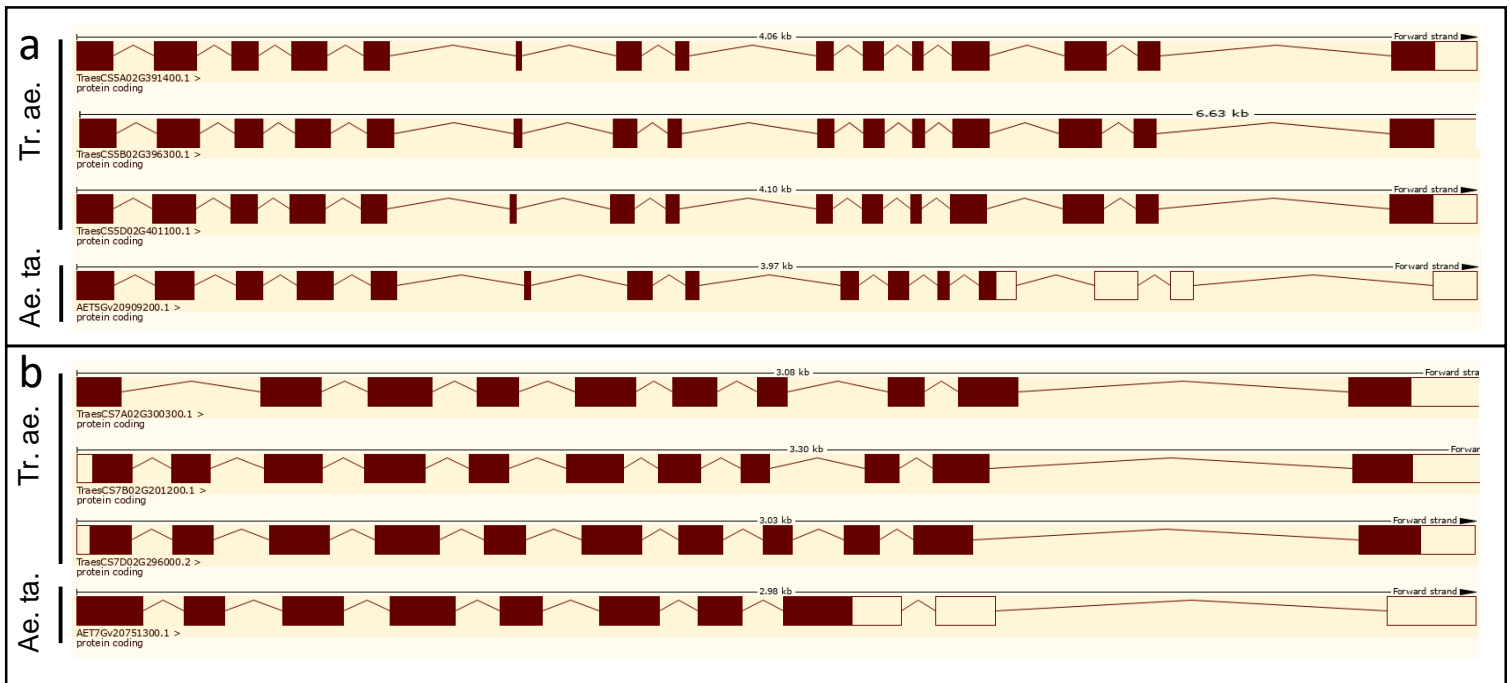


Figure 45 : Composition en exons et introns des gènes Spo11-1 (a) et Spo11-2 (b) de blé tendre (Tr. ae.) et comparaison avec la composition de ces mêmes gènes chez *Aegilops tauschii* (Ae. ta.). Les exons sont matérialisés par les rectangles bordeaux plein pour les exons confirmés et vides pour les exons putatifs placés après le putatif codon STOP. Les introns sont matérialisés par les lignes courbes entre les exons.

pour les deux gènes de blé, chaque pied d'intron a été vérifié afin que ceux-ci soient GT-AG. En complément, les CDS obtenus ont été alignés sur les séquences génomiques et les CDS des gènes Spo11-1 et Spo11-2 de l'ancêtre du génome D, *Aegilops tauschii*, et les 6 contigs de départ ont été soumis à la plateforme d'annotation en ligne Triannot. L'alignement des CDS sur les séquences génomiques et les CDS d'*Aegilops tauschii* a permis de confirmer l'annotation manuelle des CDS des deux gènes de blé tendre. La soumission des contigs correspondant aux trois copie homéologues du gène Spo11-2 à la plateforme Triannot a aussi permis de confirmer l'annotation manuelle du CDS pour les copies 7AL et 7DL. Le contig de la copie 7BL était trop court pour être soumis à la plateforme en ligne. En ce qui concerne les contigs correspondant aux trois copies du gène Spo11-1, la plateforme Triannot a permis de confirmer l'annotation du CDS pour les copies 5AL et 5BL, mais non pour la 5DL où aucun gène n'a été détecté, un trop grand nombre de N étant présent dans la séquence. Les six protéines (SPO11-1-5-AL, 5BL, 5DL et SPO11-2-7AL, 7BL et 7DL) ont toutes une longueur de 386 ou 387aa (Table 7). Par la suite, la publication du génome de référence complet du blé tendre ainsi que son annotation (266) a permis de confirmer les séquences des CDS et des protéines déterminées manuellement. L'Annexe 7 indique toutes les séquences génomiques, CDS, protéiques des six protéines.

4.2.2 Organisation et conservation des gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre.

Les trois copies homéologues du gène Spo11-1 sont composées de 15 exons et de 14 introns (Figure 45). Les séquences exoniques sont similaires à 98% et les séquences génomiques à 93-95%. Celles du gène Spo11-2 comportent 11 exons et 10 introns (Figure 45). Les copies du génome B et D sont identiques à 98% au niveau exonique et à 91% au niveau génomique. Le CDS de la copie du gène Spo11-2 portée par le génome A présente quant à elle une délétion de deux nucléotides au début

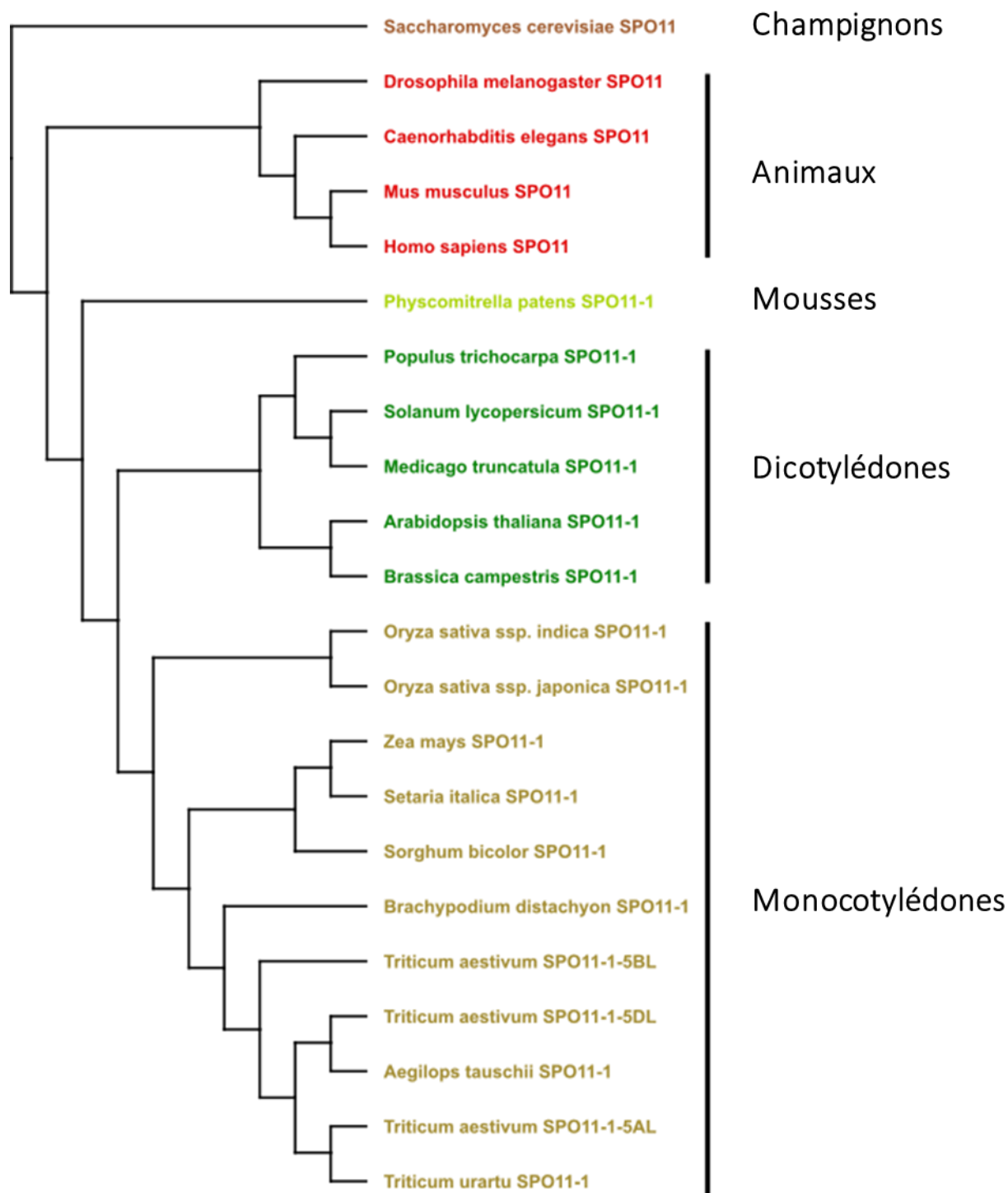


Figure 46 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de séquences de protéines SPO11-1 de plantes et de mousse, et de séquences de protéines SPO11 d'animaux et de champignons.

du gène qui abaisse sa similarité à 90% par rapport aux deux autres copies. En revanche sa séquence génomique conserve une similitude à hauteur de 91% par rapport au génome B mais celle-ci descend à 88% par rapport au génome D. Dans l'ensemble, pour les deux gènes, les copies A et D sont les plus divergentes au niveau des exons et de la séquence génomique.

Lors de l'alignement avec les séquences CDS et génomiques de la protéine SPO11-1 des ancêtres *Aegilops tauschii* (pour le génome D) et *Triticum urartu* (pour le génome A), il a été remarqué que celles-ci sont conservées par rapport aux séquences des génomes A et D de blé avec une similitude avoisinant les 100%, avec notamment une conservation quasi parfaite des structures des introns et des SNP. En effet, par exemple les SNP que l'on détecte entre les copies A et D (que ce soit dans les exons ou dans les introns) sont aussi présents dans les séquences des ancêtres. La même étude a été réalisée pour les séquences CDS et génomiques de la protéine SPO11-2 avec les mêmes résultats, une conservation quasi parfaite de la structure du gène. Par la suite, une étude approfondie du gène Spo11-1 a été réalisée.

4.2.3 Conservation de la protéine SPO11-1 au sein du règne végétal

SPO11-1 étant une protéine clé dans le processus fondamental de la méiose, elle a longtemps été considérée comme étant généralement conservée chez de nombreuses espèces de plantes (206). Nous voulions donc savoir si les protéines de blé SPO11-1 (TaSPO11-1-5A, TaSPO11-1-5B et TaSPO11-1-5D) étaient elles aussi conservées. Nous avons donc élaboré un arbre phylogénétique (Figure 46) basé sur la séquence en acides aminés de plusieurs protéines SPO11-1, provenant de différentes espèces de plantes, notamment des monocotylédones, des dicotylédones et des mousses (Table 2, Annexe 8). Nous avons également collecté les séquences des protéines SPO11 d'animaux et de champignons en tant que groupes externes (Table 2, Annexe 8). Il est intéressant de noter que

la phylogénie basée sur la protéine SPO11-1 (et SPO11) reflète le classement phylogénétique des plantes (Figure 47, Table 2) (267, 268). Comme prévu, les plantes sont séparées des animaux et des champignons. Étonnamment, au sein du règne végétal, la mousse est bien séparée des plantes à fleurs, qui sont également parfaitement séparées en monocotylédones et en dicotylédones. Ces résultats suggèrent que la protéine SPO11-1 semble suivre le modèle évolutif des plantes.

En raison de certaines incohérences dans les séquences annotées d'ADNc des gènes *Spo11-1* de *Triticum urartu* et d'*Aegilops tauschii*, nous avons décidé d'annoter à nouveau ces séquences à la main en utilisant la séquence de blé nouvellement annotée comme base pour les sites d'épissage. *Aegilops tauschii* est connu pour l'ancêtre direct du génome D (269) et *Triticum urartu* l'un des donneurs du génome A (270). Fait intéressant, si nous examinons de près les séquences des protéines SPO11-1A et D du blé par rapport à leurs ancêtres respectifs, nous constatons qu'il existe une similitude de 100% entre les protéines SPO11-1D du blé et SPO11-1 d'*Aegilops tauschii* et de 98% entre SPO11-1A et SPO11-1 de *Triticum urartu*. Il y a même des SAP (Single Amino Acid Polymorphism) conservé entre la séquence protéique du SPO11-1 de blé et celle de l'ancêtre respectif. Les SAP Cys/Ser en position 64 et Ser/Asp en position 66 entre la protéine SPO11-1 de *Triticum urartu* et d'*Aegilops tauschii* sont conservés entre les génomes A et D du blé. Ceci est également vrai pour les SNP lorsque nous avons comparé les séquences génomiques de ces gènes. Ce résultat signifierait que depuis l'événement de polyploïdisation la séquence de SPO11-1 de blé n'a pas évolué, ce qui renforce la nature très conservée de ce gène méiotique.

4.2.4 Domaines parfaitement conservés entre le blé et *Arabidopsis* pour la protéine SPO11-1.

Les régions fonctionnelles de la protéine SPO11-1 d'*Arabidopsis thaliana* ont déjà été décrites. Le

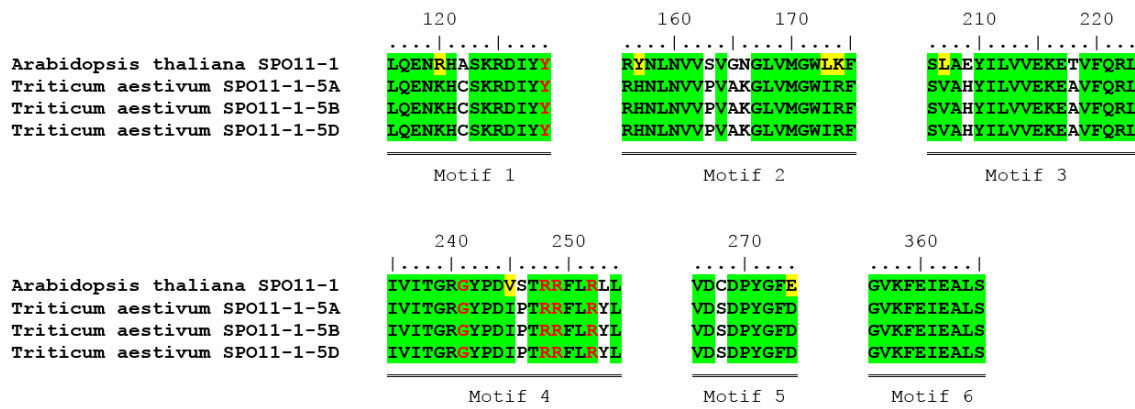


Figure 48 : alignement des protéines SPO11-1 de *Triticum aestivum* et *Arabidopsis thaliana*. Seuls les motifs conservés sont représentés. Les acides aminés conservés sont surlignés en vert et les acides aminés similaires sont surlignés en jaune. La tyrosine catalytique (Y) impliquée dans l'activité de cassure double-brins et les glycines (G) et arginines (R) conservées, impliquées dans l'activité de cassure liaison à l'ADN, sont indiquées en rouge.

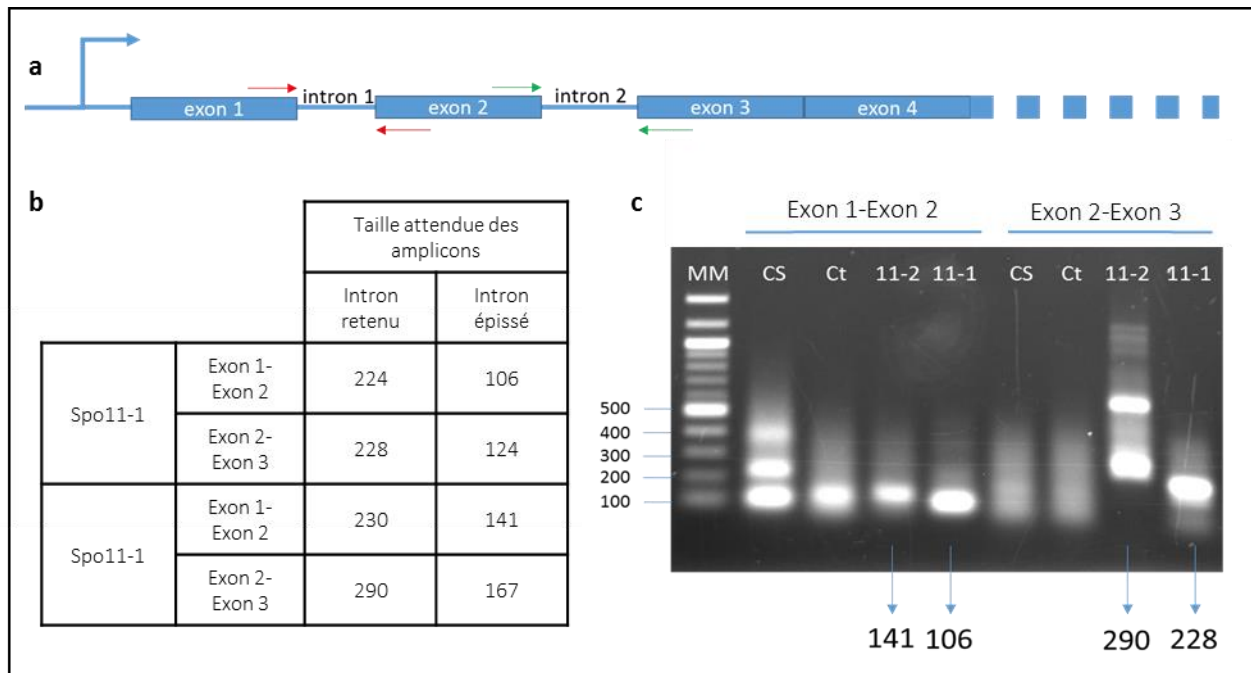


Figure 49 : Vérification de l'épissage des introns 1 et 2 des transcrits des transgènes SPO11-1 ou SPO11-2 dans des plantes T0. a : positions des amorces encadrant les introns 1 et 2 de SPO11-1 et 2 spécifiquement. b : tableau indiquant les tailles théoriques attendues des amplicons PCR obtenus avec les amorces spécifiques, avec ou sans présence de l'intron. c : RT-PCR sur feuilles provenant des T0 portant les constructions 28-626 SPO11-2 et 28-626 SPO11-1. La taille des amplicons majoritaires obtenus pour chaque échantillon T0 est indiquée par la flèche. MM : marqueur moléculaire. 11-1 : plante transformée avec la construction TAL28-Spo11-1. 11-2 : plante transformée avec la construction TAL28-Spo11-2. CS : contrôle Chinese Spring. Ct : contrôle Courtot.

résidu Tyr103 a été montré comme étant le domaine catalytique de l'induction des DSB (208) et les résidus Gly215, Arg222, Arg223 et Arg226 sont impliqués dans l'activité de liaison à l'ADN avec les résidus Gly215 et Arg222 requis pour le fonctionnement méiotique in vivo de SPO11-1 (271). Ces résidus font partie de 5 motifs fonctionnels identifiés chez plusieurs espèces (272). Ici, nous avons aligné les trois protéines de blé TaSPO11-1 sur la protéine *Arabidopsis* et avons pu récupérer tous les résidus et les 5 motifs fonctionnels (Figure 48) montrant des similitudes allant de 66 à 85% au sein de ces motifs et à 55% pour l'ensemble des séquences. La tyrosine active est située en position 129, les glycines et les arginines impliquées dans la liaison à l'ADN sont situées en position 241, 248, 249 et 252, respectivement pour TaSPO11-1-5A et TaSPO11-1-5D. Pour TaSPO11-1-5B, en raison d'une délétion d'un acide aminé en position 67, la position de la tyrosine active est 128, et celles pour les glycines et les arginines sont 240, 247, 248 et 251.

4.2.5 Epissage

Pour des raisons hypothétiques de régulation pré transcriptionnelle, nous avons décidé de conserver les deux premiers introns des deux gènes Spo11-1 et Spo11-2 dans les premières constructions SpiX. Cependant, une expérience de RT-PCR montre que l'intron 2 des deux gènes n'était pas épissé correctement dans les feuilles de plantes transformées avec les premières constructions SpiX (Figure 49). L'ARN messager a été extrait de feuilles de plantes sauvages Chinese Spring et Courtot ainsi que de plantes transformées avec les constructions SpiX TAL28-SPO11-1 et TAL28-SPO11-2. Les ARN ont subi une reverse transcription afin de générer de l'ADNc pour une PCR. Dans chaque cas les amorces amplifient une région partant de l'exon 1 à l'exon 2 et de l'exon 2 à l'exon 3. Sur la Figure 49, nous pouvons observer un signal dans les plantes dites sauvages. Alors que l'on s'attendrait à une absence d'expression des protéines Spo11-

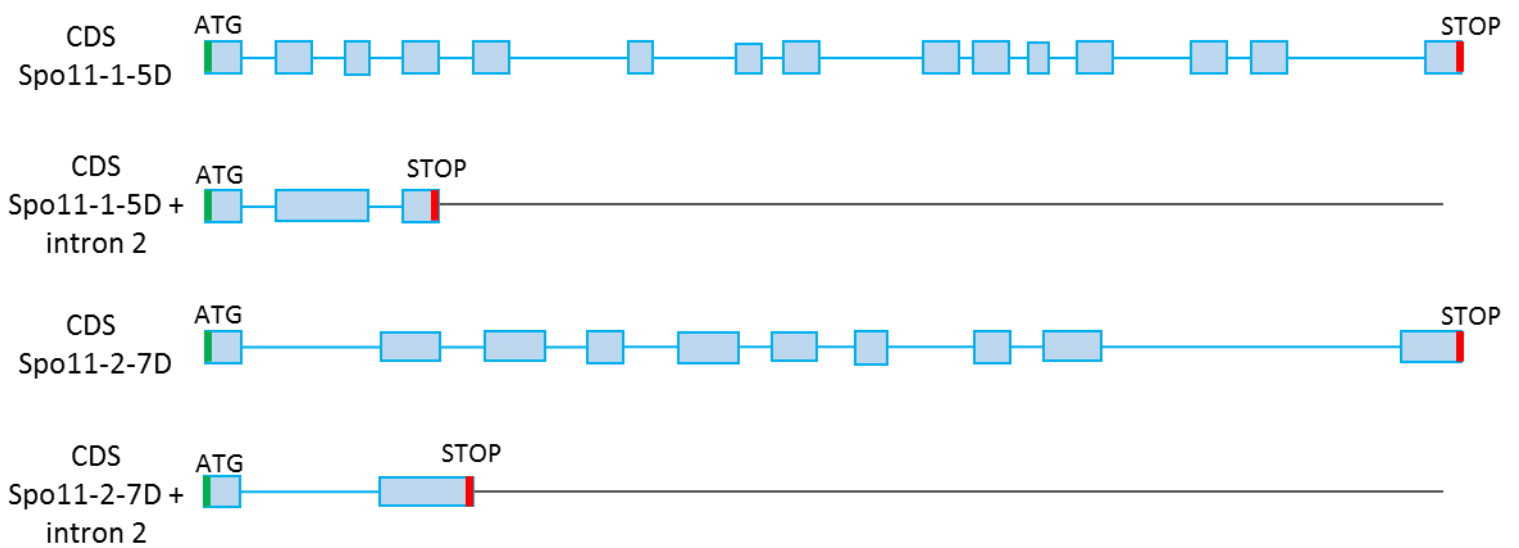


Figure 50 : Comparaison des séquences Spo11-1 et Spo11-2 copie D sans et avec la rétention de l'intron 2. La séquence théorique du CDS après rétention de l'intron 2 a été alignée avec le CDS d'origine pour les deux gènes. Les exons putatifs sont matérialisés par les rectangles bleus et les introns par les lignes les reliant. Les ATG sont représentés par les traits verts et les codon STOP par les traits rouges.

1 et 2 dans les feuilles, ce signal peut s'expliquer par le fait que le gène serait exprimé aussi dans les feuilles mais que l'ARN en résultant serait un variant d'épissage non conforme, comme le suggéraient Sprink et Hartung en 2014 (206). Dans le cas des plantes SpiX nous observons une amplification correspondant à la région allant de l'exon 1 à l'exon 2 et présentant une taille de 106pb et 141pb (respectivement pour Spo11-1 et Spo11-2) correspondant au cas où l'intron 1 est épissé. Néanmoins, nous observons l'inverse pour ce qui est de la région allant de l'exon 2 à l'exon 3 avec une amplification de 228pb et 290pb (respectivement pour Spo11-1 et Spo11-2) correspondant à la taille théorique de l'amplification (124pb et 167pb, respectivement pour Spo11-1 et Spo11-2) à laquelle s'ajoute la valeur de la taille de l'intron 2 (104pb et 123pb, respectivement pour Spo11-1 et Spo11-2). Le cas est similaire pour le projet mené sur le maïs (P Rogovsky, communication personnelle), l'intron 2 est retenu mais cela ne cause qu'un allongement de la protéine d'une trentaine d'acides aminés sans modifier le reste de la séquence. Dans le cas du blé tendre, la rétention des introns 1 et 2, dans les deux gènes, que ce soit séparément ou simultanément, cause in silico l'apparition prématuré d'un codon stop et la traduction de l'ARN messager en une protéine tronquée non fonctionnelle (Figure 50).

Les travaux précédents réalisés sur le gène Spo11-1 ainsi que le défaut d'épissage nous ont conduit à focaliser la suite de notre étude sur ce gène uniquement, et d'utiliser sa version ADNc dans les futures constructions SpiX.

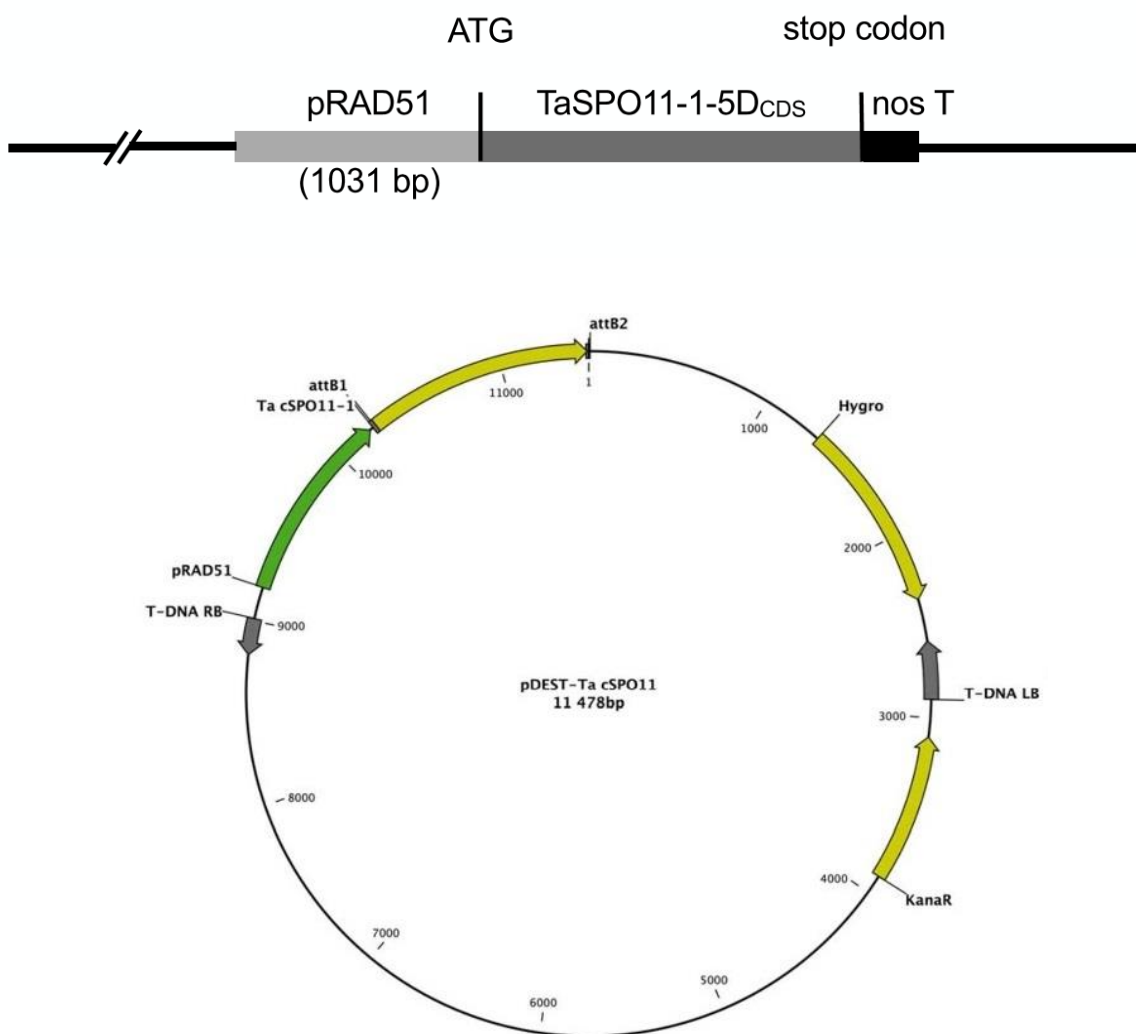


Figure 51 : Construction génique et vecteur de transformation par *Agrobacterium* pour la complémentation hétérologue. a : la séquence codante du gène Spo11-1-5D de blé tendre est mis sous le contrôle du promoteur du gène RAD51 d'*Arabidopsis thaliana* (pRAD51). ATG : début de la transcription. Stop codon : arrêt de la transcription. Nos T : terminateur de la nopaline synthase. b : la construction génique est contenue dans un vecteur plasmidique pour la transformation par *Agrobacterium*. Hygro : gène de sélection des plantes transformées, résistance à l'hygromycine. KanR : gène de sélection bactérien, résistance à la kanamycine.

4.2.6 Complémentation hétérologue de mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2 par les gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre

Pour valider la fonctionnalité de la version CDS du gène Spo11-1, il aurait été nécessaire de compléter un mutant de blé tendre pour le gène. Malheureusement il est très compliqué d'obtenir un mutant pour les trois copies présentes en deux exemplaires (diploïdie de chaque génome) dans chaque génome du blé tendre. Cela implique d'avoir deux copies du gène mutées de façon homozygote et le maintien de la troisième copie à l'état hétérozygote afin de conserver la fertilité indispensable à la production des embryons immatures pour l'étape de transgénése. Les banques de mutants EMS et d'irradiation disponibles pour le blé tendre n'ont pas été élaborées sur les variétés que nous utilisons ici et quand bien même, pour nettoyer le fond génétique, de multiples croisements sont nécessaires pour ne conserver que la mutation qui nous intéresse et éliminer des mutations parasites qui pourraient affecter le phénotype étudié. Face à ces problématiques de complémentation intra-espèce, nous avons fait le choix de procéder à une complémentation hétérologue d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2 avec les orthologues de ces gènes chez le blé tendre sous leur formes CDS.

4.2.6.1 L'expression hétérologue du gène TaSPO11-1-5D de blé rétablit la fertilité du mutant spo11-1 d'Arabidopsis.

Comme décrit ci-dessus, la protéine SPO11 de type topoisomérase est essentielle dans la plupart des eucaryotes pour initier la recombinaison méiotique. La situation est encore plus complexe chez les plantes où plusieurs homologues non redondants de Spo11 ont été identifiés et se sont révélés essentiels pour la formation de CDB méiotiques. Les résultats présentés ci-dessus indiquent que les protéines SPO11-1 sont hautement conservées parmi les espèces de plantes et en particulier au

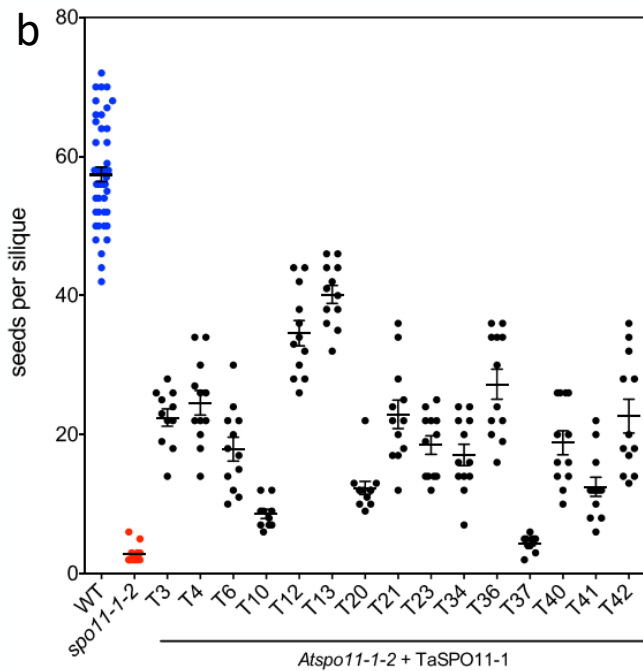


Figure 52 : Complémentation d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* pour le gène Spo11-1 avec le gène orthologue de blé tendre. a : comparaison entre des inflorescences d'*Arabidopsis* sauvage (*Col0*), mutantes pour le gène Spo11-1 (*Atspo11-1*) et complémentées avec le gène Spo11-1 de blé (*Atspo11-1-2 + TaSPO11-1_{CDS}*). b : comptage du nombre de graines par silique des transformants primaires (*Atspo11-1-2 + TaSPO11-1*) (noir). Le nombre de graines par silique du sauvage (WT) et indiqué en bleu et celui du mutant (*spo11-1-2*) est indiqué en rouge.

niveau des modules partagés avec les topoisomérases à ADN de type II. Sur la base de cette observation, nous avons prédit que les protéines végétales SPO11-1 présentaient une fonction conservée au cours de l'évolution dans la formation de DSB méiotiques. Pour tester cette prédiction, nous avons cherché à déterminer si l'expression de la protéine SPO11-1 provenant d'une espèce modèle monocotylédone (ici le blé tendre) permettrait de restaurer le phénotype méiotique du mutant *spo11-1* d'*Arabidopsis*, plante modèle dicotylédone. Les mutants d'*Arabidopsis spo11-1* ne parviennent pas à former des CDB méiotiques, ce qui conduit à un phénotype stérile (204). La complémentation peut donc être facilement visualisée par l'augmentation de la production de graines par silique. La séquence codante du gène *Spo11-1* extraite du génome D du blé tendre (TaSpo11-1-5D; voir ci-dessus) a été synthétisée et placée sous le contrôle du promoteur du gène *Rad51* d'*Arabidopsis* (Figure 51). Ce promoteur a été choisi parce que (i) *Rad51* semble avoir une expression plus élevée que SPO11-1 dans les méiocytes d'*Arabidopsis* (273–275) et (ii) ce promoteur s'est avéré efficace pour compléter d'autres mutants méiotiques d'*Arabidopsis* (Olivier Da Ines, communication personnelle).

Cette construction a été introduite dans des plantes hétérozygotes *Arabidopsis SPO11-1/spo11-1-2* et des transformants primaires exprimant la protéine TaSPO11-1-5D ont été sélectionnés sur un milieu de sélection à l'hygromycine. Le génotypage par PCR du locus *Spo11-1* de 41 transformants primaires de TaSpo11-1 a montré que 15 étaient homozygotes pour l'allèle *spo11-1-2* (*spo11-1-2/spo11-1-2*), 15 hétérozygotes (*SPO11-1/spo11-1-2*) et 11 étaient de type sauvage (*SPO11-1/SPO11-1*). Ces proportions ne suivent pas une distribution mendélienne dû au caractère aléatoire de la transformation génétique et à la sélection. De manière remarquable, 14 plantes mutantes homozygotes *spo11-1-2* sur 15 exprimant la protéine TaSPO11-1-5D ont présenté une augmentation significative de la fertilité par rapport au mutant *spo11-1-2* (Figure 52-B). Comme prévu, les mutants *spo11-1-2* produisent une quantité de graines très réduite et présentent une

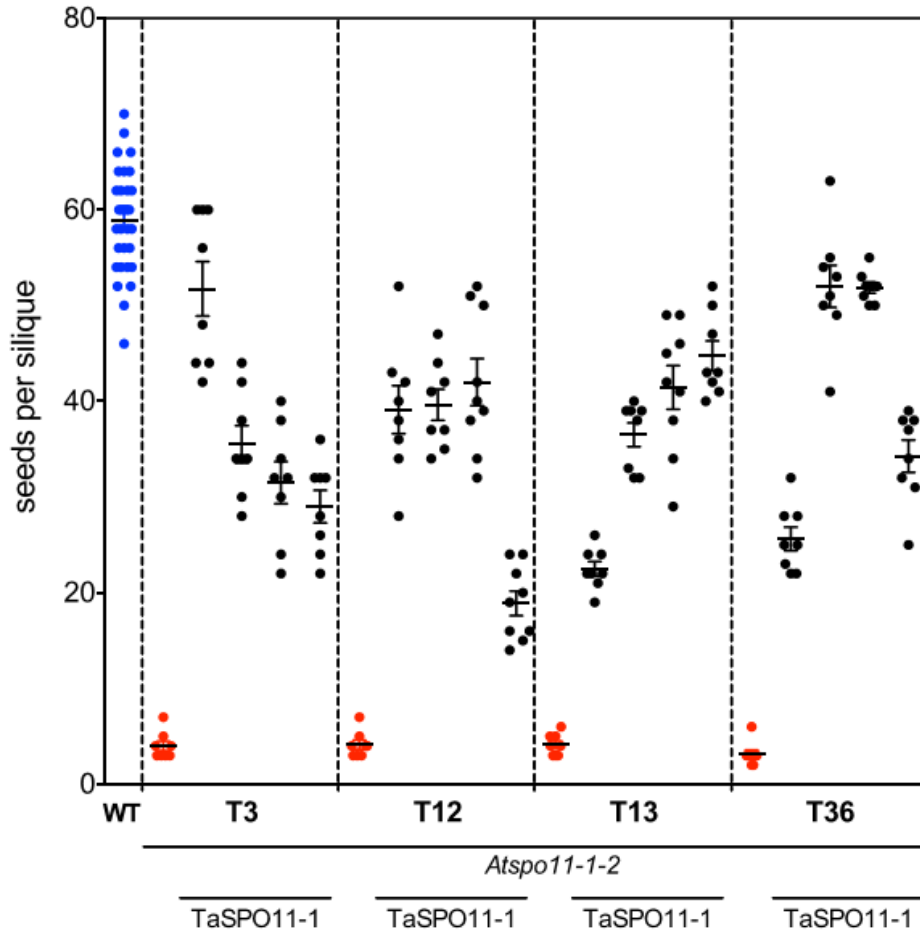


Figure 53 : Co-ségrégation du transgène de blé TaSPO11-1 dans la descendance des plantes d'*Arabidopsis* complémentées avec ce transgène et du phénotype complémenté. Les graines des plantes complémentées et portant le transgène (T3, T12, T13 et T36) sont semées et les graines issues des descendants sont comptées. Les descendants ayant conservé le transgène sont en noir et les ségréants nuls sont en rouge. Le sauvage est en bleu.

fertilité résiduelle d'environ 5% par rapport au type sauvage (Figure 52-A) (204). En revanche, la fertilité résiduelle dans les transformants primaires variait de 8% à 70%, la plupart des lignées présentant une fertilité résiduelle de l'ordre de 20 à 40%. Pour confirmer que la restauration de la fertilité est due à la présence du transgène, nous avons évalué la fertilité dans la descendance (génération T2) de 4 plantes T1 sélectionnées de manière aléatoire. Ces lignées ont montré un schéma de ségrégation de 3:1 sur un milieu de sélection à l'hygromycine suggérant une insertion de l'ADN-T à un seul locus. Comme le montre la figure 53, la complémentation co-ségrége strictement avec le transgène dans la génération T2. Ces résultats démontrent que l'expression hétérologue de la protéine TaSPO11-1-5D de blé tendre est capable de restaurer la fertilité du mutant *spo11-1-2* d'*Arabidopsis*.

4.2.6.2 *Une progression méiotique de type sauvage est observée chez les mutants spo11-1-2 d'Arabidopsis complémentés par le gène TaSPO11-1-5D de blé tendre*

Nous avons examiné la méiose mâle des plantes mutantes pour *spo11-1* et complémentées par le gène TaSPO11-1-5D de blé en colorant des chromosomes avec du 4',6-diamidino-2 phénylindole (DAPI). Dans les plantes de type sauvage, les chromosomes méiotiques se condensent, recombinent et synapse pendant la prophase I (Figure 54-A). Une synapse complète des homologues est observée au pachytène (figure 54-B). Les chromosomes se condensent ensuite davantage et cinq bivalents (chromosomes homologues liés entre eux par un chiasma et la cohésion des chromatides sœurs) sont observés en métaphase I (Figure 54-C). Les chromosomes homologues se séparent ensuite aux pôles opposés pour donner deux ensembles de cinq chromosomes en métaphase II (Figure 54-D). La méiose II se poursuit ensuite et donne lieu à 4 noyaux haploïdes équilibrés (Figure 54-E). En revanche, les mutants *spo11-1* sont caractérisés par

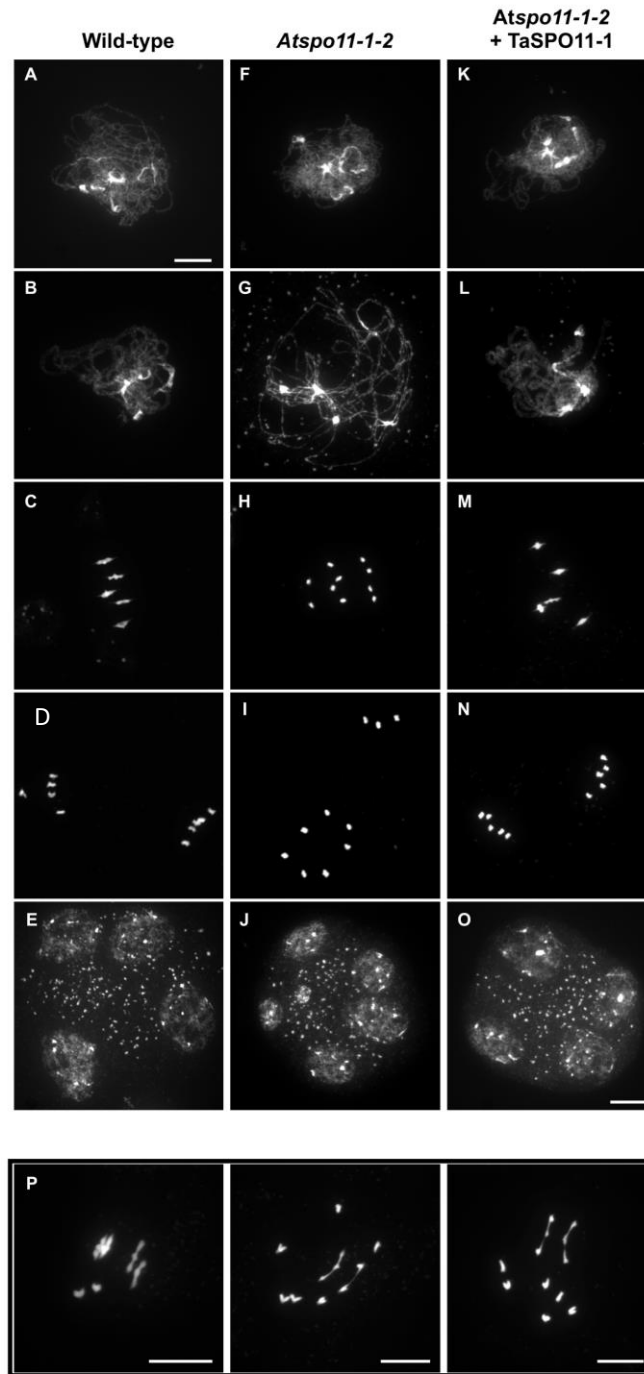


Figure 54 : Progression méiotique dans des siliques d'*Arabidopsis* sauvage (Wild-type), mutantes pour le gène Spo11-1 (*Atspo11-1-2*) et complémentées avec le gène Spo11-1 de blé (*Atspo11-1-2* + TaSPO11-1). Après étalement, les chromosomes sont colorés au DAPI et observé sous microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager.Z1 motorisé (Zeiss) avec un objectif à huile PL Apochromat 100X/1.40. Les photographies ont été prises avec une caméra AxioCam MRm (Zeiss) pilotée par le logiciel ZEN Pro (Zeiss). Les images capturées ont ensuite été traitées et ajustées pour la luminosité et le contraste avec les logiciels ZEN Pro et ImageJ FIJI. A, F, K : prophase I. B, G, L : pachytène. C, H, M : métaphase I. D, I, N : métaphase II. E, J, O : fin de méiose II. P : métaphase I du mutant complémenté.

un manque de formation de DSB et donc l'absence de recombinaison (Figure 54-F-J). En conséquence, l'appariement et la synapse des chromosomes homologues sont altérés chez le mutant *spo11-1* (Figure 54-G). Cela aboutit à un déficit de crossovers visible en métaphase I par la présence de 10 univalents (Figure 54-H). La mauvaise ségrégation des chromosomes produit finalement une métaphase II non équilibrée (Figure 54-I) et des polyades (Figure 54-J). L'analyse cytogénétique de la progression méiotique dans les cellules mères de pollen de plantes mutantes *spo11-1-2* exprimant la protéine TaSPO11-1-5D a révélé un comportement méiotique normal (Figure 54-K-O). En particulier, une métaphase I avec 5 bivalents a pu être observée (Figure 54-M). La ségrégation des chromosomes homologues en anaphase I (Figure 54-N), suivie de la séparation des chromatides sœurs au cours de la deuxième division donnent alors les 4 produits méiotiques haploïdes attendus (Figure 54-O).

Il est toutefois important de noter que, bien qu'une métaphase I normale a été observée, la plupart des métaphases I présentaient un mélange de bivalents et d'univalents (Figure 54-P). Ceci est conforme à la fertilité accrue mais incomplète observée dans nos plantes complémentées. Pour déterminer le niveau de complémentation atteint, nous avons estimé le nombre moyen de bivalents et de chiasmas en métaphase I durant la méiose mâle dans des plantes de type sauvage, mutant *spo11-1-2* et dans les plantes *spo11-1-2/spo11-1-2* complémentées avec TaSPO11-1-5D. Nous avons sélectionné deux lignées transgéniques indépendantes homozygotes pour le transgène TaSPO11-1-5D et présentant une fertilité d'environ 40%. Nous avons d'abord examiné la fréquence des bivalents par cellule sur la base du nombre d'univalents et de bivalents en métaphase I. Les résultats sont présentés à la figure 55. Comme prévu, dix univalents intacts sont observés en métaphase I chez le mutant *spo11-1-2* (0,05 bivalents/cellule; n = 19) au lieu de 5 bivalents chez le sauvage (n = 36). Dans les deux lignées complémentées, nous avons observé une moyenne de 1,7 (n=57) ou 2,6 (n=74) bivalents par cellule représentant une augmentation de 30 à 50 fois

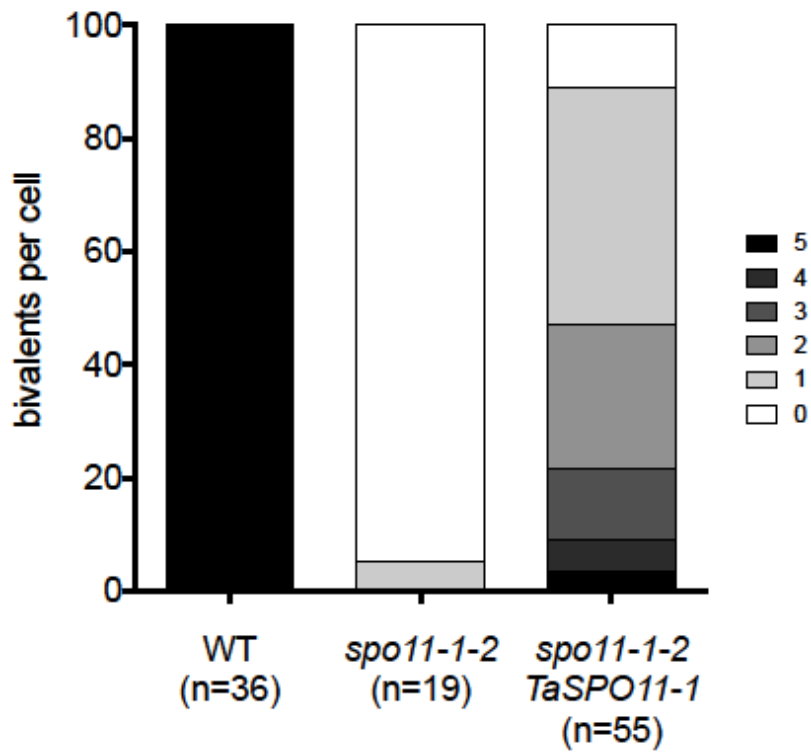


Figure 55 : Fréquence des bivalents par cellule dans des plantes d'*Arabidopsis* mutées pour le gène Spo11-1 complémentées par le gène orthologue du blé tendre. Après étalement chromosomique et coloration au DAPI, le nombre d'univalents et le nombre de bivalents en métaphase 1 ont été comptés.

supérieure à celle du mutant *spo11-1-2* d'*Arabidopsis* (Figure 55). En conséquence, le nombre de chiasmas par cellule a augmenté de manière significative dans les lignées complétées, avec une moyenne dans la lignée 3 de 2 chiasmas par cellule ($\pm 1,7$, $n=57$) et dans la lignée 36 de 3,6 ($\pm 2,6$, $n=74$). Ceci est fortement contrasté par rapport aux 0,05 chiasmas par cellule chez le mutant *spo11-1-2* ($\pm 0,2$, $n = 19$) mais inférieur à celui des plantes de type sauvage ($9,3 \pm 0,8$, $n = 36$).

4.2.6.3 *La protéine SPO11-1-5D de blé interagit fonctionnellement avec les protéines SPO11-2 et MTOPVIB d'Arabidopsis pour induire la formation de CDB au cours de la méiose.*

Il a été démontré que SPO11-1 interagissait avec SPO11-2 et MTOPVIB pour former un complexe de type topoisomérase VI qui catalyse la formation de CDB méiotique (209, 276). Nous avons donc cherché à déterminer si TaSPO11-1-5D interagissait également avec les protéines SPO11-2 et MTOPVIB d'*Arabidopsis* pour l'initiation de la recombinaison méiotique. Nous avons croisé des plantes transgéniques *spo11-1_TaSPO11-1-5D* avec des mutants d'*Arabidopsis spo11-2* ou *mtop6b* et analysé la fertilité des doubles mutants. Comme le montre la figure 56, la suppression de SPO11-2 ou de MTOPVIB chez des plantes transgéniques *spo11-1_TaSPO11-1-5D* entraîne une perte de fertilité. Cela indique que TaSPO11-5D n'induit pas seul les CDB, mais nécessite (et est capable) d'interagir avec AtSPO11-2 et AtMTOPVIB.

Nos données montrent donc que l'expression hétérologue de la protéine TaSPO11-1-5D de blé rétablit la fertilité et la progression méiotique du mutant *spo11-1* d'*Arabidopsis*. Ceci établit clairement que la protéine TaSPO11-1-5D de blé est capable de remplacer la protéine SPO11-1 d'*Arabidopsis* dans sa fonction méiotique essentielle et est donc l'orthologue chez le blé de la protéine SPO11-1.

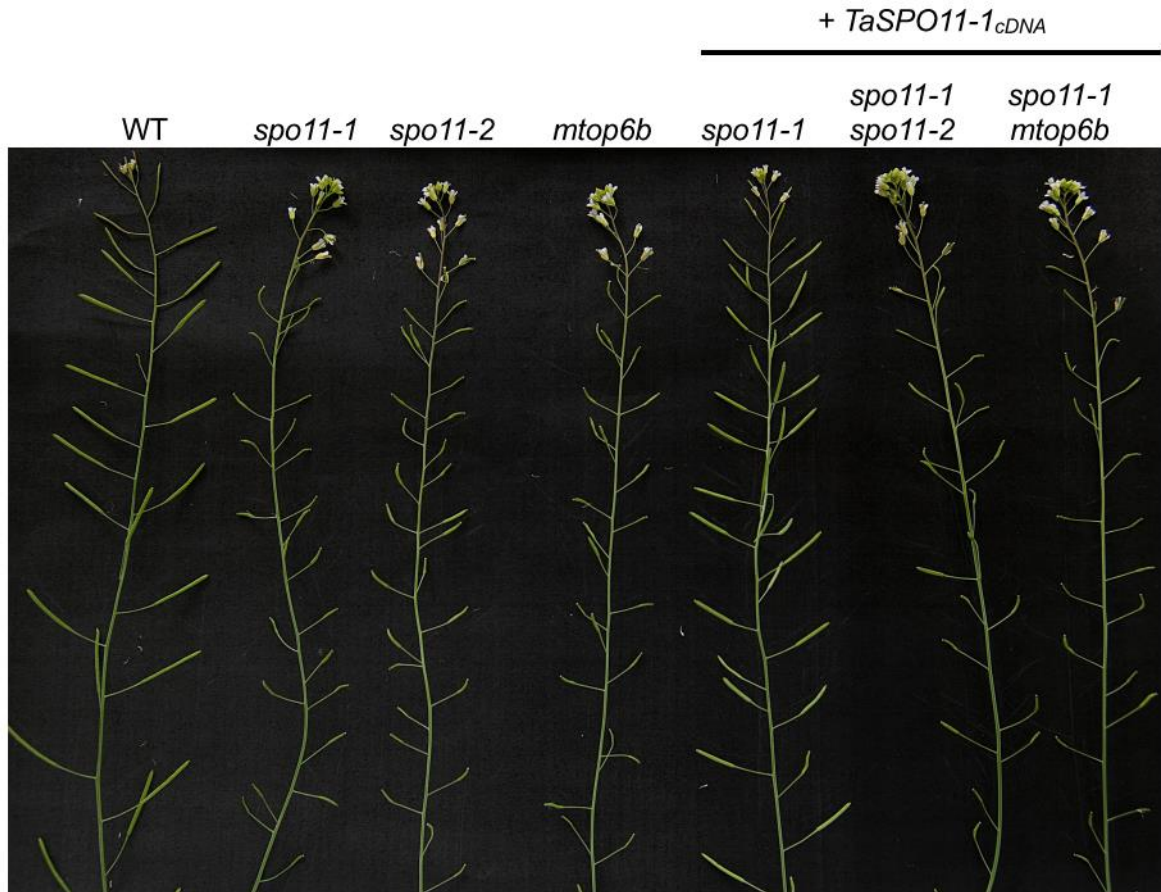


Figure 56 : Complémentation d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* pour le gène Spo11-1 avec le gène orthologue de blé tendre et de double mutants pour le gène Spo11-1 et Spo11-2 et Spo11-1 et MTOP6B. a : comparaison entre des inflorescences d'*Arabidopsis* sauvage (*Col0*), mutantes pour le gène Spo11-1 (*spo11-1*), mutantes pour le gène Spo11-2 (*spo11-2*), mutantes pour le gène MTOP6B (*mtop6b*), mutantes pour le gène Spo11-1 et complémentées avec le gène Spo11-1 de blé (*spo11-1 + TaSPO11-1cDNA*), double mutantes pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2 et complémentées avec le gène Spo11-1 de blé (*spo11-1/spo11-2 + TaSPO11-1*) et double mutantes pour les gènes Spo11-1 et MTOP6B et complémentées avec le gène Spo11-1 de blé (*spo11-1/mtop6b + TaSPO11-1*).

4.2.6.4 La protéine TaSPO11-2 de blé peut remplacer la protéine SPO11-2 d'*Arabidopsis*

Les résultats présentés ci-dessus nous ont amenés à examiner si d'autres membres du complexe de CDB, à savoir SPO11-2, présentaient également une fonction conservée dans l'évolution. La même stratégie que celle décrite ci-dessus pour TaSPO11-1 a été utilisée. La séquence codante du gène TaSPO11-2-7D de blé a été placée sous le promoteur du gène Rad51 d'*Arabidopsis* et cette cassette d'expression a ensuite été insérée dans une plante mutante hétérozygote *Atspo11-2-3*. Les transformants primaires ont ensuite été isolés sur un milieu de sélection et leur fertilité a été analysée.

De manière remarquable, les 10 plantes mutantes homozygotes *spo11-2* analysées exprimant la protéine TaSPO11-2 ont présenté une augmentation significative de la fertilité par rapport au mutant *spo11-2* (Figure 57). La fertilité des différents transformants est restaurée de 50% à 100% par rapport à celle des plantes sauvages. Ainsi, l'efficacité de la complémentation du mutant *spo11-2* d'*Arabidopsis* par la protéine SPO11-2 de blé est même supérieure à celle obtenue avec la protéine SPO11-1 de blé (voir chapitre 4.2.6.1). Ceci a été confirmé par une analyse cytogénétique de la progression de la méiose (Figure 58). Nous avons observé une progression méiotique normale dans une plante transgénique *spo11-2*/TaSPO11-2 et une moyenne de 4,4 bivalents par cellule ($n = 35$) et de 8,2 chiasmas par cellule ($\pm 2,7$, $n = 30$). Nos données montrent donc que la protéine TaSPO11-2 de blé peut se substituer à la protéine SPO11-2 d'*Arabidopsis*.

Ici nous avons démontré la complémentation efficace de deux mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2. Nous avons aussi affiné la filiation phylogénétique de ces deux gènes au sein du règne des plantes et montré que ceux-ci sont extrêmement conservés et suivent la classification phylogénétique générale des espèces végétale et animales incluses dans l'étude. Cette étude nous a permis de valider la fonctionnalité de la protéine SPO11-1 issue de la séquence codante du gène Spo11-1-5D de blé tendre que j'ai définie et que nous utilisons conjointement avec

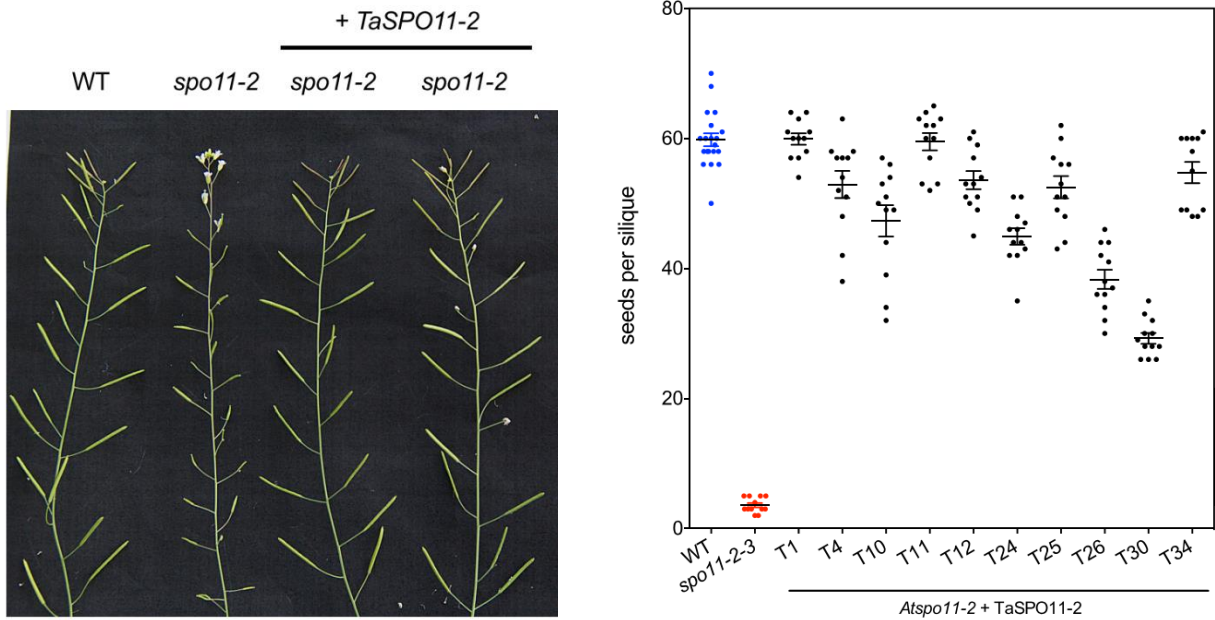


Figure 57 : Complémentation d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* pour le gène Spo11-2 avec le gène orthologue de blé tendre. a : comparaison entre des inflorescences d'*Arabidopsis* sauvage (*Col0*), mutantes pour le gène Spo11-2 (*spo11-2*) et complétementées avec le gène Spo11-2 de blé (*spo11-2* + *TaSPO11-2*). b : comptage du nombre de graines par silique des transformants primaires (*Atspo11-2* + *TaSPO11-2*) (noir). Le nombre de graines par silique du sauvage (WT) et indiqué en bleu et celui du mutant (*spo11-2-3*) est indiqué en rouge.

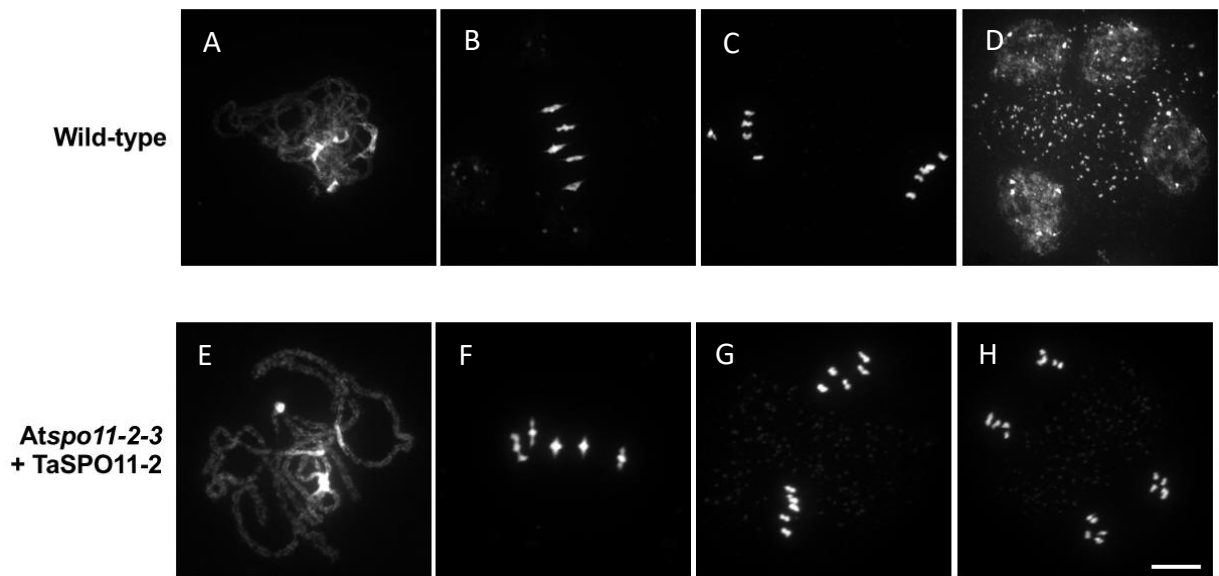


Figure 58 : Progression méiotique dans des siliques d'*Arabidopsis* sauvage (Wild-type) et complétementées avec le gène Spo11-2 de blé (*Atspo11-2-3* + *TaSPO11-2*). Après étalement, les chromosomes sont colorés au DAPI et observé sous microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager.Z1 motorisé (Zeiss) avec un objectif à huile PL Apochromat 100X/1.40. Les photographies ont été prises avec une caméra AxioCam MRm (Zeiss) pilotée par le logiciel ZEN Pro (Zeiss). Les images capturées ont ensuite été traitées et ajustées pour la luminosité et le contraste avec les logiciels ZEN Pro et ImageJ FIJI. A, E : prophase I. B, F : métaphase I. C, G : métaphase II. D, H : fin de méiose II.

les domaines de liaison à l'ADN TAL et le système de ciblage CRISPR/dCAS9 pour la mise au point de la technologie SpiX sur le blé tendre. L'ADNc peut donc être utilisé pour l'élaboration des constructions futures pour un ciblage efficace de la recombinaison.

4.3 La technologie Spix appliquée au Blé tendre

4.3.1 Ciblage sur le chromosome 3B

Le système SpiX repose sur le ciblage de la séquence ADN pour l'induction de cassures double-brins, il faut pour ceci déterminer des séquences cibles dans le génome de l'organisme d'intérêt. Lors de la mise au point du système SpiX dans la levure, les séquences cibles étaient des séquences UAS fixées par le domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 de levure. Chez le blé tendre, le nombre de ces séquences UAS se monte à 2 956 186 sur la totalité du génome, ce qui est bien au-delà des capacités de génotypage et d'analyse en routine de la recombinaison. Nous avons donc limité notre choix à quelques cibles le long du chromosome 3B du blé tendre, chromosome originellement séquencé au sein du laboratoire et dont la séquence de sa pseudo-molécule était disponible au début du projet. Plusieurs critères concernant ces cibles ont été retenus : être présentes dans des régions identifiées comme non-recombinantes ou faiblement recombinantes, situées dans des promoteurs de gènes, uniques au sein de tout le génome du blé tendre.

4.3.1.1 *Analyse des zones ciblées sur le chromosome 3B*

Une analyse approfondie de ces 19 séquences déterminées comme des cibles uniques potentielles pour la technologie Spix dans des régions non-recombinantes a été réalisée pour savoir si celles-ci présentaient des similitudes. Une recherche de motif grâce à l'outil MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (277) révèle que celles-ci ne présentent *a priori* aucun motif conservé entre elles (Figure 59). Le plus grand (Figure 59), cependant, se retrouve dans 2 d'entre elles (15 et 47), faisant partie des zones cibles choisies. Celui-ci a une longueur de 48pb et est majoritairement composé de GC (Figure 60). Par ailleurs, le contenu en GC des zones cibles en régions non recombinantes est en moyenne de 49% avec une fluctuation allant de 30 à 60% (Table 8).

Table 8 : Zones cibles en zones non-recombinantes et recombinantes et composition en GC.

Nom de la cible	Zone	Taille (pb)	%GC
UniqSeqTalN100pb_09	non-recombinantes	100	54%
UniqSeqTalN100pb_11	non-recombinantes	100	51%
UniqSeqTalN100pb_15	non-recombinantes	100	50%
UniqSeqTalN100pb_17	non-recombinantes	100	56%
UniqSeqTalN100pb_18	non-recombinantes	100	49%
UniqSeqTalN100pb_21	non-recombinantes	100	54%
UniqSeqTalN100pb_22	non-recombinantes	100	60%
UniqSeqTalN100pb_28	non-recombinantes	100	34%
UniqSeqTalN100pb_35	non-recombinantes	100	58%
UniqSeqTalN100pb_37	non-recombinantes	100	44%
UniqSeqTalN100pb_38	non-recombinantes	100	42%
UniqSeqTalN100pb_40	non-recombinantes	100	39%
UniqSeqTalN100pb_43	non-recombinantes	100	42%
UniqSeqTalN100pb_44	non-recombinantes	100	30%
UniqSeqTalN100pb_46	non-recombinantes	100	35%
UniqSeqTalN100pb_47	non-recombinantes	100	53%
UniqSeqTalN100pb_55	non-recombinantes	100	60%
UniqSeqTalN100pb_56	non-recombinantes	100	58%
UniqSeqTalN100pb_61	non-recombinantes	100	58%
UniqSeqTalR100pb_11	recombinantes	100	45%
UniqSeqTalR100pb_26	recombinantes	100	48%
UniqSeqTalR100pb_25	recombinantes	100	58%
UniqSeqTalR100pb_27	recombinantes	100	51%
UniqSeqTalR100pb_28	recombinantes	100	76%
UniqSeqTalR100pb_08	recombinantes	100	47%
UniqSeqTalR100pb_09	recombinantes	100	60%
UniqSeqTalR100pb_10	recombinantes	100	63%
UniqSeqTalR100pb_13	recombinantes	100	59%
UniqSeqTalR100pb_12	recombinantes	100	68%
UniqSeqTalR100pb_14	recombinantes	100	61%
UniqSeqTalR100pb_01	recombinantes	112	58%
UniqSeqTalR100pb_15	recombinantes	100	59%
UniqSeqTalR100pb_16	recombinantes	100	33%
UniqSeqTalR100pb_17	recombinantes	100	39%
UniqSeqTalR100pb_18	recombinantes	100	52%
UniqSeqTalR100pb_03	recombinantes	98	53%
UniqSeqTalR100pb_19	recombinantes	100	34%
UniqSeqTalR100pb_20	recombinantes	100	47%
UniqSeqTalR100pb_21	recombinantes	100	40%
UniqSeqTalR100pb_22	recombinantes	100	61%
UniqSeqTalR100pb_23	recombinantes	100	69%
UniqSeqTalR100pb_24	recombinantes	100	45%

Au fil de nos investigations nous nous sommes interrogés sur la pertinence de ne choisir que des cibles dans des régions non recombinantes. Il nous est apparu que non seulement l'absence de recombinaison pouvait être dû à une répartition des événements de recombinaison au niveau des télomères, à un contrôle épigénétique de la fixation des protéines responsable de l'apparition des crossover, mais aussi à une inaccessibilité physique de ces régions par ces protéines, due à une compaction importante de la chromatine à cet endroit (278). Face à ces hypothèses, nous avons fait le choix de constituer un deuxième set de départ pour le dessin de cibles à partir de régions faiblement recombinogènes, écartant ainsi la possibilité d'une inaccessibilité physique des potentielles cibles dessinées. Ainsi, 23 zones cibles théoriquement uniques de 100pb ont été trouvées le long du chromosome 3B. De ces 23 zones cibles, 3 ont été sélectionnées pour dessiner des séquences cibles. Cependant, au contraire des zones cibles dans les régions non recombinantes qui devaient répondre aux critères des TAL, celles dans les régions dites recombinantes doivent répondre aux critères pour le dessin de guides CRISPR uniquement. Ainsi ce sont les zones cibles 01, 12 et 14 qui ont été choisies. Cependant, sur le même mode opératoire que précédemment les 23 zones cibles ont été analysées plus finement. Une recherche de motif grâce à l'outil MEME a aussi été faite et révèle que celles-ci ne présentent *a priori* aucun motif conservé entre elles (Figure 59), à l'instar des zones cibles non-recombinantes. Le même motif que précédemment (Figure 60) a cependant aussi été retrouvé dans 5 d'entre elles, dont les cibles 12 et 14, faisant partie des zones choisies. Le contenu en GC des zones cibles en région recombinantes est en moyenne de 53% avec une fluctuation allant de 33 à 76% (Table 8), ce qui n'est pas différent des proportions identifiées dans les zones cibles dans les régions non recombinantes.

Ainsi, les deux lots de zones cibles identifiés à la fois dans des régions non recombinantes et recombinantes sont homogènes dans leur séquence avec néanmoins des motifs différents au sein

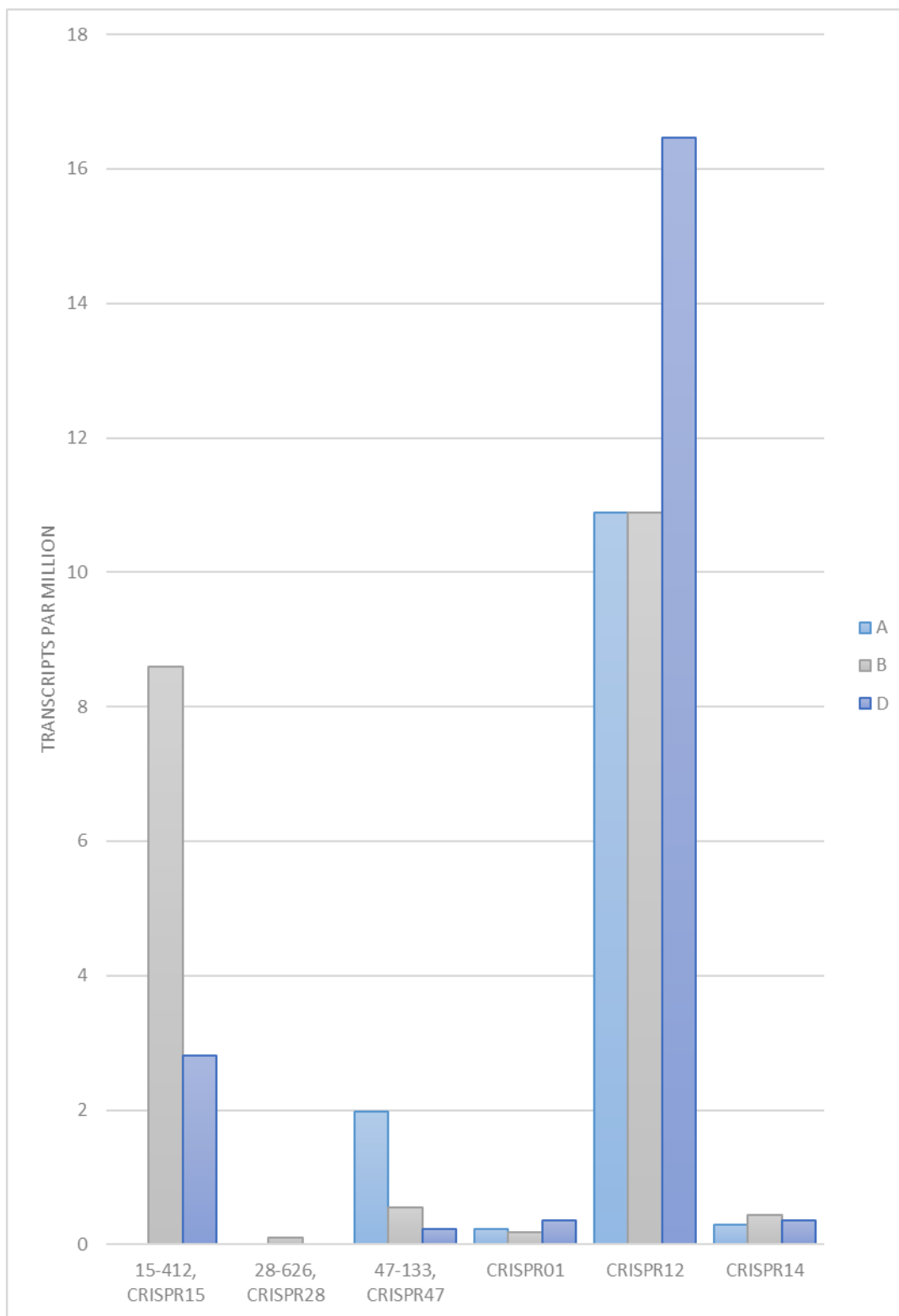


Figure 61 : Expression des gènes ciblés par les domaines TAL et CRIPSR sur le génome B (gris) et des homéologues sur les génomes A (bleu clair) et D (bleu) durant la méiose. L'expression est exprimée en transcrit par million (tpm).

de ces zones cibles. Il est alors intéressant d'analyser plus finement chaque cible dessinée à la fois pour les TAL et pour les CRISPR.

4.3.1.2 Analyse des cibles TAL

Trois cibles ont été dessinées à partir des trois zones 15, 28 et 47. Ces cibles respectent les critères requis pour le dessin de cibles TAL spécifiés dans le chapitre 3.3.2 et sont nommées 15-412, 28-626 et 47-133. Les séquences correspondantes de 25pb sont données dans la Table 9. Elles ont un taux de GC de 76, 72 et 84% respectivement pour les 15-412, 28-626 et 47-133, et sont localisées dans les promoteurs des gènes *TraesCS3B02G253000*, *TraesCS3B02G408400*, *TraesCS3B02G140700*, respectivement. Ces trois gènes sont redondants et présentent des homéologues sur les deux autres génomes A et D, sauf pour le premier qui n'a pas d'homéologue identifié sur le génome A (Table 9). Le gène correspondant à la cible 15-412 est impliqué dans le métabolisme des carbohydrates (ou glucides), qui est une fonction métabolique de base. Celui-ci est exprimé lors de la méiose, seul la copie A ne montre aucun signe d'expression (Figure 61). Le promoteur de celui-ci serait alors physiquement accessible, le gène étant exprimé au moment où la construction SpiX doit agir. La cible 15-412 en elle-même est unique sur tout le génome du blé mais présente une copie similaire à 92% sur le génome D et 4 autres ailleurs dans le génome (68% de similitude, Annexe 9). Le gène correspondant à la cible 28-626 n'a pas de fonction identifiée. Celui-ci n'est pas exprimé lors de la méiose, il s'agirait d'un pseudogène et seule la copie B montre une très faible expression (Figure 61). Le promoteur de celui-ci est alors théoriquement accessible. La cible 28-626, à l'instar de la précédente, est unique sur tout le génome du blé et présente deux copies similaires à 92% sur le génome A et 84% sur le génome D. D'autres séquences sont similaires à 76% ailleurs dans le génome (Annexe 9). Le gène correspondant à la cible 47-133 est

Table 9 : Cibles TAL et CRISPR utilisées avec leur composition, les gènes ciblés et l'expression de ce gènes en méiose.

Cibles	Domaine de liaison		Séquence	Taille	%GC	Gène du promoteur ciblé	Expression en méiose	Homéologues
	TAL	à l'ADN						
15-412	TAL		TCCGCACCCGGACCCGGCGTCGCCACT	25	76	TraesCS3B02G253000	oui	D
28-626	TAL		IGAGCACGCCGGCAGACGCCCGTCTG	25	72	TraesCS3B02G408400	oui ? (faible)	A, D
47-133	TAL		TCGCGGGCCCCCGCGTCCGCCACT	25	84	TraesCS3B02G140700	oui	A, D
CRISPR15	dCas9/CRISPR		GGTCCGGTCCGGAGACCCGAC	20	75	TraesCS3B02G253000	oui	D
CRISPR28	dCas9/CRISPR		GTCTCAACTTTTGAGCACGC	20	50	TraesCS3B02G408400	oui ? (faible)	A, D
CRISPR47	dCas9/CRISPR		GTGCGAGGCGCAAAACGGGC	20	70	TraesCS3B02G140700	oui	A, D
CRISPR01	dCas9/CRISPR		GTGACCCGCGGAAGGTCTAGA	20	65	TraesCS3B02G422500	oui	A, D
CRISPR12	dCas9/CRISPR		GCGTCCGCCGAGGCCGAAGCG	20	80	TraesCS3B02G401900	oui	A?, D?
CRISPR14	dCas9/CRISPR		GGTGAGCTGCCCGTTAAAGG	20	60	TraesCS3B02G422300	oui	A, D

impliqué dans les voies de régulation par l'auxine, voies généralement constitutives. Celui-ci est exprimé lors de la méiose (Figure 61), et donc le promoteur de celui-ci est alors théoriquement accessible lors de la méiose. La cible 47-133, contrairement aux deux précédentes, n'est pas unique sur tout le génome du blé et présente une copie similaire à 100% sur le génome A et une autre à 96% sur le génome D. D'autres séquences sont similaires à 68% ailleurs dans le génome (Annexe 9). Le fait que cette cible ne soit pas unique est dû au fait que les séquences utilisées pour la recherche de zones cibles n'étaient pas complètes et que celles-ci se sont vues améliorées depuis l'obtention de la nouvelle séquence du génome du blé (266).

4.3.1.3 Analyse des cibles CRISPR

En tout, ce sont 6 cibles CRISPR qui ont été dessinées, trois correspondant aux trois zones cibles non-recombinantes ayant servi pour le dessin des trois cibles TAL et trois correspondant aux trois zones cibles recombinantes. Elles sont nommées respectivement CRISPR15, CRISPR28, CRISPR47, CRISPR01, CRISPR12 et CRISPR14. Les séquences correspondantes de 20pb sont données dans la Table 9. Les trois premières ont pour cibles les mêmes promoteurs que les cibles TAL15, TAL28 et TAL47. Les trois suivantes ciblent les promoteurs des gènes TraesCS3B02G422500, TraesCS3B02G401900 et TraesCS3B02G422300 (respectivement pour CRISPR01, CRISPR12 et CRISPR14). Les gènes TraesCS3B02G422500 et TraesCS3B02G422300 présentent des homéologues identifiés sur les deux autres génomes A et D (Table 9). TraesCS3B02G401900 n'a pas d'homéologue clairement identifié, mais un candidat potentiel est présent sur les deux autres génomes (Table 9). Le gène correspondant à la cible CRISPR01 n'a pas de fonction identifiée mais la protéine en résultant présente des répétitions contenant des pentatricopeptides. Celui-ci est exprimé lors de la méiose (Figure 61). Le promoteur

de celui-ci serait alors physiquement accessible. La cible CRISPR01 en elle-même n'est pas unique sur tout le génome du blé et présente une copie similaire à 100% sur le génome D et une autre à 80% sur le génome A (Annexe 9). Elle ne présente cependant pas d'autres cibles externes potentielles (off-target). Le gène correspondant à la cible CRISPR12 est impliqué dans la liaison aux ARN avec une activité de déphosphorylation du domaine C terminal de l'ARN polymérase II. Celui-ci est exprimé lors de la méiose (Figure 61). Le promoteur de celui-ci serait alors physiquement accessible. La cible CRISPR12 en elle-même est unique sur tout le génome du blé et présente 3 copies similaires à 80% sur le génome A et une autre aussi à 80% sur le génome A (Annexe 9). Elle présente cependant d'autres off-targets similaires à 80% ailleurs dans le génome (Annexe 9). Le gène correspondant à la cible CRISPR14 coderait pour une protéine chaperonne semblable à une ubiquitine. Celui-ci est exprimé lors de la méiose (Figure 61) rendant son promoteur physiquement accessible. La cible CRISPR14 en elle-même n'est pas unique sur tout le génome du blé et présente une copie similaire à 100% sur le génome D et A (Annexe 9). Elle présente une autre off-target sur le chromosome 2A, similaire à 80%.

Dans l'ensemble, les cibles (TAL ou CRISPR) sont situées dans des promoteurs de gènes exprimés au cours de la méiose, possédant des homéologues sur les génomes A et D et ayant des fonctions constitutives de base.

4.3.2 Zoom sur le promoteur UBI

Le promoteur pUBI permet une bonne expression du transgène en transformation stable chez le blé tendre (189, 198, 279) mais peu de preuve de son expression en méiose existait (280). Nous avons à notre disposition des graines descendant d'une lignée de blé transformée stable avec le gène

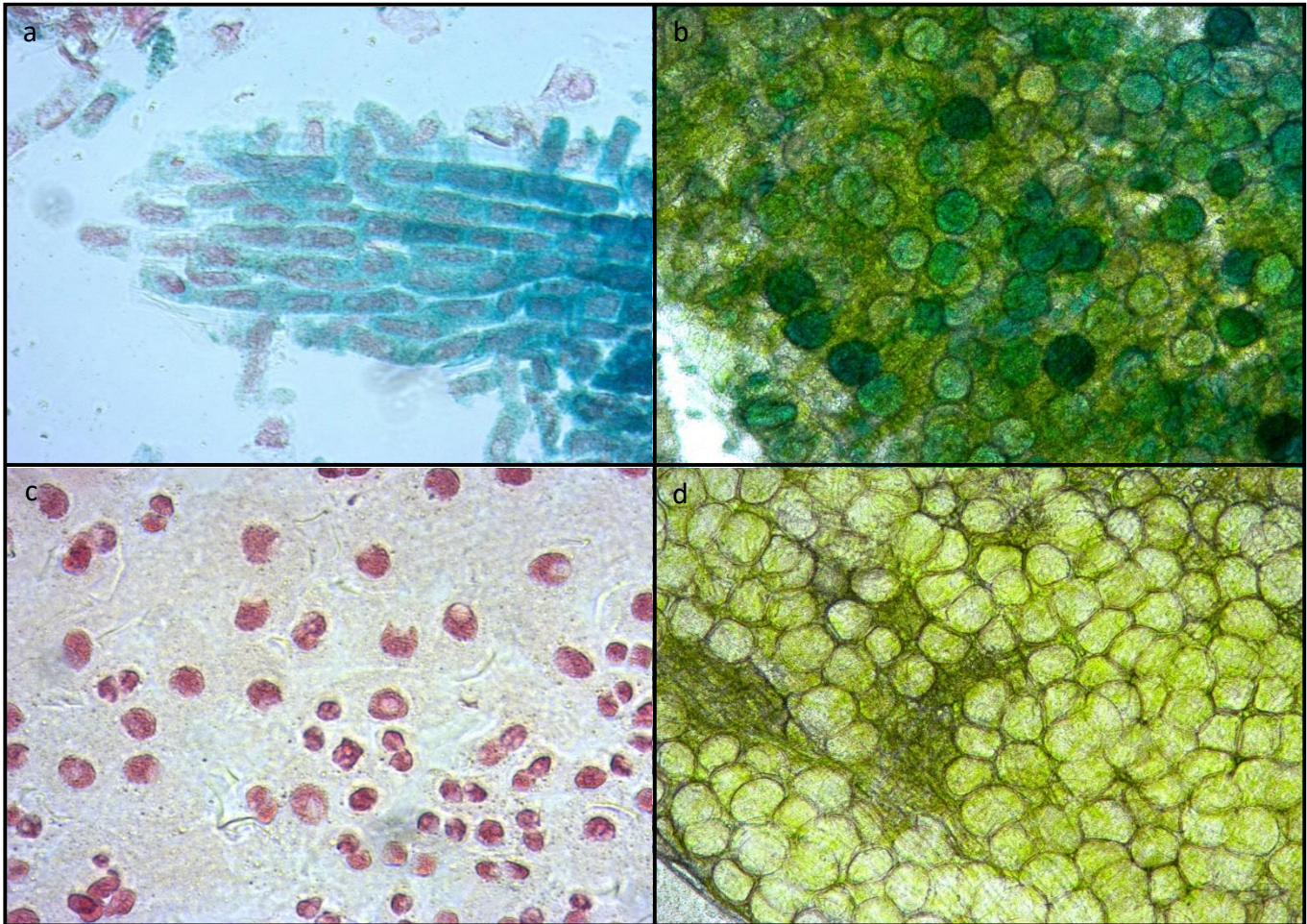


Figure 62 : Fonctionnalité du promoteur UBI en méiose. Des anthères prélevées à différents stades de développement sur des plantes sauvages et des plantes transformées stable avec le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur UBI ont été préalablement incubées dans une solution contenant le substrat X-Gluc. L'observation a été faite sous microscope. a : anthère immature au stade pré-méiotique colorée au Carmin-acétique et provenant d'une plante transformée de manière stable avec la construction UBI::GUS. On peut observer les noyaux colorés en violet. b : anthère immature au stade post-méiotique provenant d'une plante transformée de manière stable avec la construction UBI::GUS. On peut observer des structures rondes qui sont les grains de pollen. c : anthère immature au stade pré-méiotique colorée au Carmin-acétique et provenant d'une plante sauvage. Les noyaux des cellules sont aussi visibles en violet. d : anthère immature au stade post-méiotique provenant d'une plante sauvage. Comme pour b les structures rondes sont les grains de pollen.

rapporteur GUS sous le contrôle de ce même promoteur pUBI. Les grains de cette lignée ainsi que celle d'une lignée sauvage ont donc été semés et les plantes cultivées jusqu'à pouvoir récupérer des anthères aux stades pré-méiotique et post-méiotique. Celle-ci sont alors mises en contact avec un substrat liquide contenant le substrat X-Gluc (acide 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronique). Le gène GUS qui code pour une β -glucuronidase provenant d'*Escherichia coli*, lors d'une incubation à 37°C, va cliver le substrat X-Gluc pour produire un précipité bleu et insoluble qui confère alors une coloration bleue indigo. Sur la figure 62 nous pouvons observer que les anthères pré et post-méiotiques sauvages ne présentent aucune coloration après incubation alors que celles provenant de la lignée portant la construction pUBI-GUS montrent une coloration bleue caractéristique au sein des cellules, signe d'une activité du promoteur à ces stades. Nous confirmons alors que le promoteur pUBI utilisé dans les constructions SpiX est fonctionnel durant la méiose et permet bien la production de la construction SpiX lors de celle-ci.

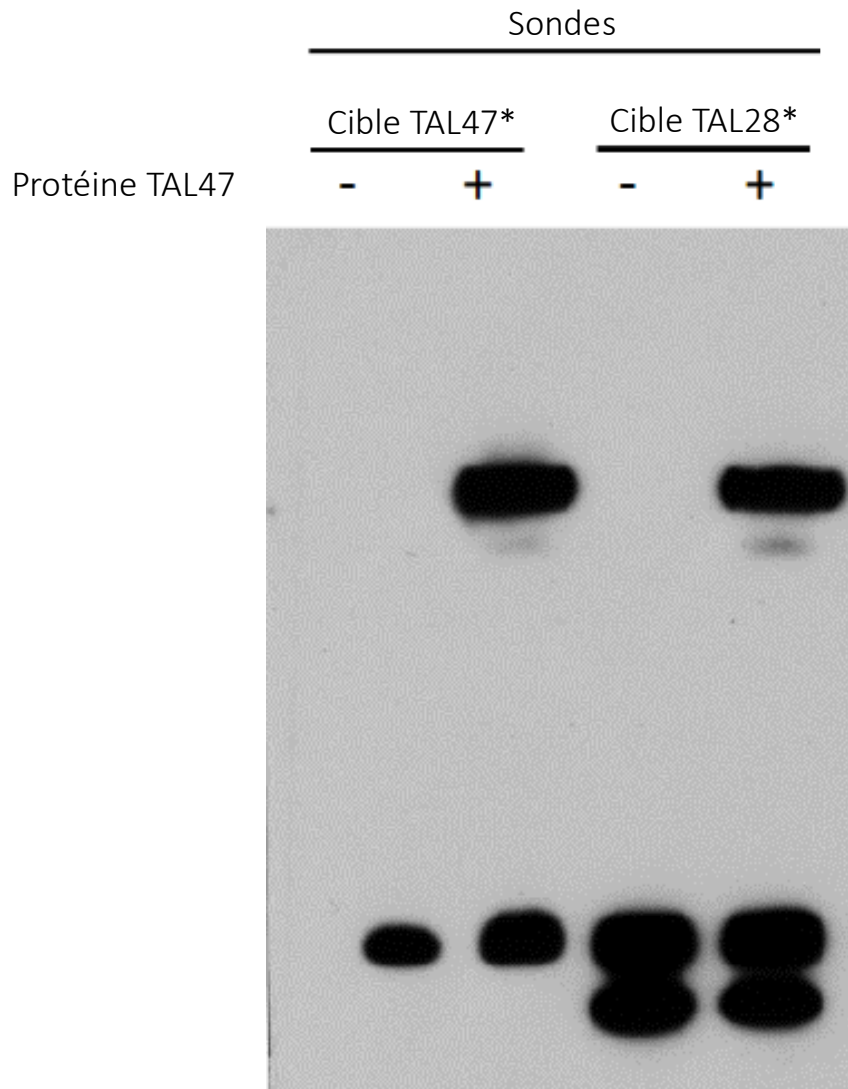


Figure 63 : Analyse de l'interaction entre les séquences cibles TAL47 et TAL28 et la protéine recombinante TAL47. Expérience de gel retard de la protéine recombinante TAL47 avec des sondes de 25 bp dérivées des cibles TAL47 et TAL28. Les produits d'interaction ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6% (v/v). Le gel a été transféré sur membrane de nylon et celle-ci révélée sur film autoradiographique après hybridation avec la Streptavidine. - et + : respectivement, absence et présence de la protéine recombinante TAL47. * : les sondes sont marquées à la biotine pour révélation.

4.4 Efficacité de la technologie SpiX sur le blé tendre

4.4.1 Ciblage de la technologie SpiX

4.4.1.1 TAL

Des tests *in vitro* de retard sur gel ont été développés afin de démontrer le ciblage des TAL à l'ADN. Des sondes correspondant aux cibles TAL et marquées à la biotine ont été mises en contact avec des protéines TAL recombinantes (produites en bactérie) (Figure 63). Dans la figure 63 nous observons la présence d'un retard sur gel pour la protéine TAL 47 avec les sondes correspondant aux cibles 47-133 et 28-626. Ceci démontre le ciblage à l'ADN mais implique que celui-ci n'est pas spécifique. Cependant, les deux cibles présentent une composition similaire (voir chapitre 4.3.1) et ceci pourrait expliquer l'interaction du TAL47 avec une autre cible proche en séquence de la cible dont il est spécifique. Les TAL que nous avons dessinés se fixent donc bien à l'ADN *in vitro* mais de manière non spécifique.

Afin de déterminer si les régions ciblées présentent de la méthylation de l'ADN, des expériences de PCR-bisulfite-séquençage ont été conduites mais en vain. Les régions ciblées présentent toutes un très fort taux de GC et il a été impossible de dessiner des amorces pour ce type d'expérience dans ces régions. De plus, les données de méthylation de l'ADN disponibles au laboratoire ne présentent pas une résolution suffisamment fine pour savoir si les cibles de 25pb contiennent une ou plusieurs cytosines méthylées.

4.4.1.2 CRISPR

Afin de vérifier l'efficacité de chacun des guides, une population de plantes T0, contenant une CAS9 fonctionnelle et les 6 guides CRISPR (voir chapitre 3.3.2) a été générée à partir de 1642 embryons hybrides immatures. 7 plantes ont été générées et 3 d'entre elles sont transformées à la

Table 10 : Campagnes de transformation par biolistique et leur résultats.

Construction	nombre d'embryon bombardé et ayant passé l'étape de callogenèse	Nombre de plantules régénérées	Nombre de plantules transformées
1ère campagne de transformation			
témoin (PMI)	535	16	10
TAL15-Spo11-1	691	20	-
TAL28-Spo11-1	760	17	4
TAL47-Spo11-1	1846	3	-
TAL15-Spo11-2	762	49	-
TAL28-Spo11-2	1033	25	14
TAL47-Spo11-2	1901	36	20
2ème campagne de transformation			
TAL15-cSpo11-1	4935	8	3
TAL28-cSpo11-1	1940	36	16
TAL47-cSpo11-1	1952	33	10
3ème campagne de transformation			
Cas9 KE + 6 guides CRISPR	1642	7	3
dCas9-cSpo11-1 + 6 guides CRIPSR	851	23	8
dCas9-cSpo11-1 + guide GASR7	527	20	-

fois avec les guides et la CAS9. L'ADN des feuilles des 7 jeunes plantules a été prélevé selon le protocole chapitre 3.7.4 et envoyé à séquencer au niveau des six cibles. Malheureusement aucun signe d'édition n'a été détecté à ce stade. Des expériences au laboratoire ont montré que des mutations pouvaient apparaître tardivement et notamment au niveau des épis, dernières parties de la plante à se former.

4.4.2 Production et génotypage de la descendance T1

Au total, pour la première série de constructions portant les TAL et les gènes Spo11-1 et Spo11-2 avec introns, sept populations de plantes T0 ont été générées à partir de plus de 6000 embryons hybrides immatures, une population témoin transformée avec juste le gène de sélection (PMI) et six autres transformées chacune avec une des six constructions plasmidiques (Table 10). Toutes les populations ont été génotypées sur les transgènes et seules les populations témoin et TAL28-Spo11-1 ont vu leur descendance T1 analysée.

Le génotypage de la population témoin (dite PMI) a confirmé l'absence totale de recombinant sur 363 individus génotypés. La seconde population analysée est la population SpiX TAL28-Spo11-1, encadrée par deux marqueurs polymorphes entre Chinese Spring et Courtot. Pour cela 282 individus T1 issus de trois plantes T0 indépendantes ont été analysés. Il en est ressorti qu'aucun individu n'était recombinant entre les deux marqueurs. Pour tester les cinq populations suivantes avec les deux autres cibles nous avons été confronté à la difficulté de trouver des marqueurs pour les cibles 15-133 et 47-412 du fait de l'absence de polymorphisme entre les deux parents utilisés dans le croisement. Aucun SNP n'a été trouvé en premier lieu, et aucun des marqueurs SSR n'était polymorphe entre les deux parents. Sur 42 marqueurs ISBP testés, seulement un seul présentait un SNP pour le génotypage de la cible 47-133. De même sur 65 marqueurs ISBP testés, seulement un

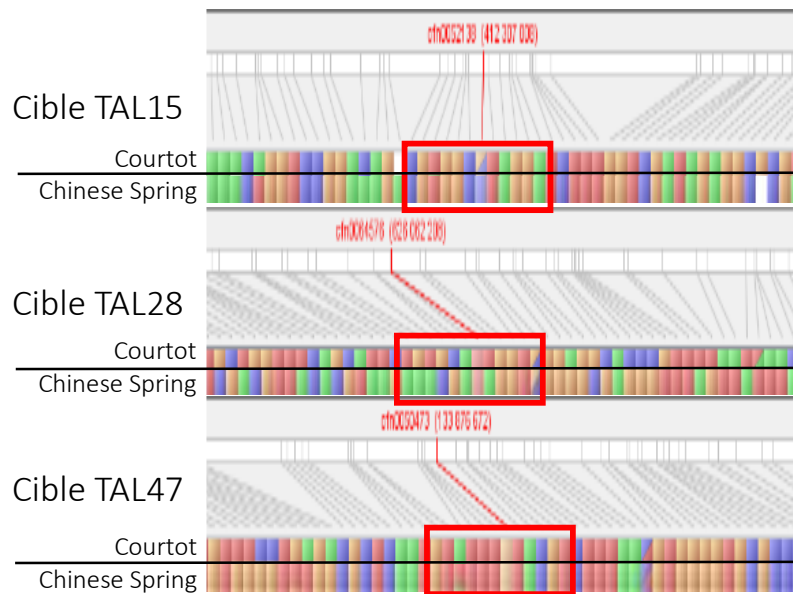


Figure 64 : Comparaison des haplotypes des variétés Courtot et Chinese Spring au niveau des régions ciblées par les protéines TAL15, TAL28 et TAL47 (cadres rouges). Les pavés de couleur représentent la nature de l’haplotype de la variété le long du chromosome 3B de blé tendre. Si entre deux variétés, à la même position, la couleur de l’haplotype est la même alors il y a peu de chances d’observer du polymorphisme entre les deux variétés.

seul présentait un SNP pour le génotypage de la cible 15-133. L'Annexe 10 indique tous les marqueurs testés, leur nature et le polymorphisme entre les deux parents. La figure 64 montre les données haplotypiques au niveau des 3 cibles dans les régions non recombinantes pour les deux parents, CS et Ct. Nous observons que pour la cible 28-626, le contexte haplotypique est hétérogène entre les deux parents, signe de la présence certaine de SNP, que nous avons trouvés. En revanche, au niveau des cibles 15-412 et 47-133, il y a une grande homogénéité entre les deux parents, corroborant la grande difficulté que nous avons pour trouver des SNP encadrant ces deux régions. Les cinq populations SpiX restantes n'ont pas été génotypées, en raison de l'absence de SNP, mais surtout du non épissage de l'intron 2 et pour économiser du temps d'expérimentation et rebondir rapidement sur la construction de nouveaux plasmides contenant cette fois-ci uniquement la séquence codante de Spo11-1. 8827 embryons hybrides immatures ont été transformés avec les trois nouvelles constructions pour donner 29 plantes transgéniques (Table 10). De gros problèmes de régénérations ont été rencontrés pour la transformation avec la construction TAL15-cSpo11-1, dues aux conditions de cultures estivales et à la prolifération des maladies à cette période, contaminant les milieux de culture *in vitro*.

La première des nouvelles populations à être génotypée fut la population T1 TAL28-cSpo11-1, toujours encadrée par les deux mêmes marqueurs polymorphes entre les deux parents. Comme précédemment, 380 individus ont été génotypés pour les deux SNP, après en avoir extrait l'ADN. Il en est ressorti là aussi qu'aucun recombinant n'était présent entre les deux marqueurs.

Face à ces résultats nous nous sommes interrogés sur notre capacité à détecter des recombinants avec l'effectif que nous avons déterminé et l'encadrement par deux SNP polymorphes. Nous avons dessiné des essais KASPar à partir de SNP polymorphes entre nos deux parents mais cette fois-ci avec un encadrement bien plus large et sortant du cadre du scaffold. Ainsi nous espérons détecter quelques recombinants naturels et permettre de valider expérimentalement cette technique sur notre

Table 11 : Analyse du taux de recombinaison dans la descendance T1 avec des marqueurs distants

Construction	Plante transgénique	Nombre de recombinants	Taille de la population T1	Taux de recombinaison
témoin PMI	1	5	55	9%
témoin PMI	2	14	48	29%
témoin PMI	3	30	55	55%
témoin PMI	4	4	16	25%
témoin PMI	5	2	16	13%
témoin PMI	6	4	32	13%
témoin PMI	7	4	32	13%
témoin PMI	8	23	55	42%
témoin PMI	9	18	55	33%
témoin PMI	10	3	16	19%
TAL28-cSpo11-1	1	38	90	42%
TAL28-cSpo11-1	2	15	90	17%
TAL28-cSpo11-1	3	7	90	8%
TAL28-cSpo11-1	4	19	91	21%

matériel et dans nos conditions d'expérimentation. Nous avons effectivement pu détecter un grand nombre de recombinants mais dans des proportions inattendues. La Table 11 ci-contre montre le nombre de recombinants obtenus pour la population témoin et pour la population SpiX en rapport au nombre total d'individus. Nous constatons que le nombre de recombinants n'est pas équivalent entre les deux populations et que la population SpiX présente sensiblement moins de recombinants que la population témoin au niveau de la même région génotypée. La table 11 montre le détail des recombinants au sein de la population témoin, elle-même constituée de plusieurs populations T1 provenant de plantes T0 distinctes. Nous constatons une certaine disparité entre les différentes sous-populations T1 avec un taux de recombinants variant de 9% à 55%. Dès lors nous pensons qu'étant donné que la région génotypée auparavant ne montre aucun recombinant alors que le nombre de ceux-ci est fluctuant par ailleurs et entre les différentes populations témoins et SpiX, l'apparition d'un ou plusieurs recombinants à l'intérieur de cet intervalle ne serait alors pas fortuit et serait imputable à la construction SpiX.

Néanmoins, l'absence de recombinants avec la deuxième version de SpiX nous amène à remettre en question le ciblage de l'ADN par le domaine de liaison à l'ADN TAL. En effet, il ne nous est pas possible de démontrer pour l'instant le ciblage des TAL à l'ADN *in vivo* et *in planta*. De plus, les protéines TAL sont connues pour être sensibles à la méthylation de l'ADN or les cibles sur le chromosome 3B sont localisées dans des promoteurs de gènes, sujet à un important turnover des marques épigénétiques dont les marques de méthylation. Nous en avons donc déduit qu'il y a de très fortes probabilités que les TAL ne se fixent pas à l'ADN, empêchant alors la technologie SpiX de fonctionner.

Pour pallier à cela nous avons décidé de changer de système de liaison à l'ADN et avons opté pour l'utilisation de système CRISPR couplé à la protéine dCAS9, elle-même fusionnée à la protéine cSPO11-1 (dCAS9-cSPO11-1). 851 embryons ont été transformés, 23 plantules ont régénéré et

huit plantes transgéniques pour les deux constructions ont été obtenues (Table 10). Une population témoin transformée avec les mêmes guides mais cette fois-ci avec une CAS9 fonctionnelle a aussi été générée (Table 10). Quelques 1642 embryons ont été transformés, sept plantules ont régénéré et trois plantes transgéniques pour les deux constructions ont été obtenues. Enfin une population de secours a été créée (Table 10) portant à la fois la construction dCAS9-cSPO11-1 et un guide de la littérature, le guide GASR7 (198). A ce jour, les plantes sont en maturation et la descendance T1 n'est pas disponible pour génotypage.





DISCUSSION ET PERSPECTIVES

5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans un contexte d'agriculture durable, de réduction des intrants et de stagnation des surfaces arables, l'amélioration des rendements est devenue un des enjeux majeurs du 21^{ème} siècle. Dans ce but, il est nécessaire d'exploiter toutes les pistes possibles et notamment la grande réserve d'allèles originaux que sont les ressources génétiques. L'exploitation de celles-ci nécessite de mieux comprendre et maîtriser les mécanismes de la recombinaison méiotique chez le blé tendre comme chez d'autres espèces cultivées. Lors de ma thèse j'ai exploité le brevet déposé par la société MeioGenix, décrivant la biotechnologie SpiX développée chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae* L.). Cette biotechnologie n'étant pas applicable en l'état chez le blé tendre, j'ai conduit des études génétiques et développé des approches de transgénèse, de biologie moléculaire et bio-informatique afin de déterminer les conditions d'utilisation de la biotechnologie SpiX chez le blé tendre.

5.1 Embryons immatures et Culture *in vitro*

Grâce à la mise au point d'une technique inédite de conservation des grains immature avant transformation par biolistique (281), il m'a été possible d'optimiser le protocole afin d'améliorer l'obtention de plantes transgéniques de blé tendre et a fortiori de populations F2 portant les constructions SpiX pour l'analyse de la recombinaison. La création de plantes transgéniques est une approche intéressante pour la validation de gènes candidats et l'édition des génomes, mais elle demeure limitée par deux facteurs principaux chez le blé tendre : l'efficacité de transformation, qui reste relativement faible et dépendante du génotype (<5% pour les meilleurs génotypes) (261), et la disponibilité d'une quantité suffisante de matériel approprié (les embryons immatures par exemple).

5.1.1 Mise en pause de la croissance des embryons

Nous n'avons observé aucune différence entre les tailles des embryons fraîchement isolés de grains immatures et celles d'embryons stockés à température ambiante pendant 4 jours ou maintenus à 4 ° C pendant 4 ou 7 jours. Ainsi, nos résultats sont conformes aux données obtenues chez la carotte (*Daucus carota* L) (282), où la taille maximale de la graine est atteinte 40 à 60 jours après la pleine floraison, tandis que le développement de l'embryon se poursuit 30 à 50 jours après. Les résultats suggèrent qu'un égrainement précoce bloque le développement des embryons chez la carotte, ce qui entraîne une mauvaise qualité de la graine. Cependant, les embryons conservés à la température ambiante pendant 7 jours sont nettement plus petits que les embryons frais. Entre 10 et 15 jours après l'anthèse, l'embryon est dans une phase de croissance exponentielle (283, 284) avec une croissance de 0,5 mm par jour. Chez le blé, la différence entre le témoin et le set conservé 7 jours à température ambiante (BW7RT) est de 0,08 mm, ce qui représente environ 4 heures pendant la phase de croissance exponentielle. BW7RT a peut-être été échantillonné plus tôt post-anthèse que le témoin, ce qui justifie la petite différence de taille.

5.1.2 Le stockage au froid préserve la capacité embryogénique des embryons immatures

Des études antérieures ont décrit l'effet positif du traitement par le froid sur l'embryogenèse somatique chez le maïs (*Zea mais*) (285), l'avoine (*Avena sativa*) (286), Prairie Milkvetch (*Astragalus adsurgens*) (287), Patula Pin (*Pinus patula*) (288), le colza oléagineux (*Brassica napus*) (289) et le pin de Monterey (*Pinus radiata*) (290). Chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), le stockage des épis collectés 11 à 12 jours après l'anthèse (DPA) pendant 13 à 16 jours à 4 ° C a une incidence significative sur le pourcentage d'embryons somatiques issus du scutellum (291).

Ils ont également montré qu'une longue période de stockage des épis à 4 ° C est nécessaire pour une embryogenèse somatique efficace. Ici, nous ne voyons aucune différence significative ni dans l'efficacité de la régénération ni dans la transformabilité par rapport au contrôle et nous n'avons trouvé aucun effet de la courte période de stockage au froid sur l'embryogenèse somatique. Nos résultats correspondent aux leurs, n'ayant pas appliqué une longue période de stockage à 4 ° C, nécessaire à la stimulation de l'embryogenèse somatique.

Nous avons aussi montré que le stockage des grains immatures jusqu'à 7 jours à température ambiante empêche la formation de calcs lors des étapes de culture *in vitro*. Lublin et Sela en 2008 (292) ont montré que, lorsque des œufs sont conservés à température ambiante, les agents pathogènes présents à leur surface sont capables de se multiplier en grand nombre. Cependant, à basse température (6 ° C), même si l'agent pathogène peut survivre jusqu'à 6 semaines, il n'est pas capable de se multiplier et d'infecter l'œuf. Dans nos expérimentations, seul un traitement de la surface du grain est effectué. Par conséquent, les bactéries qui auraient pu être introduites à l'intérieur de celui-ci par des insectes piqueurs (*Thysanoptera*) (293) ne sont pas éliminées. Comme une infection bactérienne est susceptible de se produire à température ambiante, les grains stockés à cette température peuvent développer une infection bactérienne interne pouvant contaminer l'embryon immature, ce qui le rend impropre à la transformation génétique. En revanche, le stockage au froid est susceptible de réduire la propagation bactérienne, de prévenir l'infection de l'embryon immature et de préserver son intégrité et sa capacité embryogénique.

5.1.3 Transformation d'embryons hybrides

Comme chez le maïs (294), nous avons constaté que les embryons hybrides de blé issus d'un croisement entre Chinese Spring (parent récalcitrant) et Courtot (parent transformable)

conservaient une capacité embryogène équivalente à celle des embryons du meilleur parent transformable. Cela pourrait être dû à la vigueur hybride (295), mais comme nous n'avons trouvé aucune preuve d'un tel mécanisme dans les cultures de tissus *in vitro*, nous concluons que la capacité de transformation pourrait être un trait héréditaire dominant chez Courtot par rapport à Chinese Spring. La transformabilité et plus généralement la réponse en culture *in vitro* est un trait génétiquement contrôlé et plusieurs QTL ont été identifiés (296–298). Le transfert de gènes dans le blé a également longtemps été limité à des génotypes transformables tels que Bobwhite et Florida, sélectionnés pour leur bonne réponse en culture *in vitro* et leur aptitude à la transformation. Cependant, la transformation de lignées élites de blé tendre reste difficile, principalement entre 1 et 5% (261, 299). Seuls quelques génotypes élite (15%) présentent des pourcentages allant de 6 à 8% (299) légèrement plus élevés que le cultivar de référence Bobwhite (environ 3 à 5%) (261). Les premiers résultats de la transformation d'un autre hybride dérivé d'un croisement entre Chinese Spring et Cadenza, génotype considéré comme étant transformable (1,7%) (299), viennent confirmer nos précédents résultats et l'intérêt de l'utilisation d'embryon hybrides de blé pour la biolistique. Sur 64 embryons transformés, 1 plante transgénique a été obtenue, ce qui représente un taux de transformation de 1,56%, non significativement différent du taux de transformation de Cadenza (1,7%,, p-value = 0,9324) (299).

La transformation des hybrides présente un autre avantage non négligeable : le fait que nous pouvons agir sur le génome dérivé du génotype récalcitrant. Nous n'avons actuellement aucune idée de l'endroit où le transgène serait intégré dans le génome des plantes transgénique obtenues. Théoriquement, 50% des événements seraient sur le demi-génome transformable et les 50% restant sur le récalcitrant. Le seul moyen de pouvoir déterminer s'il se trouve sur le génome transformable ou récalcitrant est de localiser génétiquement le site d'insertion du transgène. Peu de techniques sont utilisées à cet effet, dont l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (300), les approches

basées sur la PCR (PCR inversée ou médiée par ligation) (301) et le séquençage de nouvelle génération (NGS) (séquençage du génome complet ou séquençage après capture à l'aide de sondes appâts) (302, 303). Malheureusement, ces techniques sont assez difficiles à mettre en œuvre sur le blé en raison de la polyploïdie de son génome et de la fréquence élevée des séquences répétées. Une autre technique consisterait à établir une carte génétique à basse densité sur un individu F2 pour savoir sur quelle partie du génome (CS ou Ct) se trouve le transgène. A la vue des études QTL citées précédemment, la capacité de transformation serait un caractère multigénique et ne pourrait pas être facilement transférée d'un génotype sensible à un génotype récalcitrant. L'utilisation d'hybride serait alors un bon moyen d'agir sur le génome d'un génotype intéressant mais non transformable.

Dans le contexte de ce travail de thèse, il s'agit d'étudier l'effet d'une biotechnologie sur la recombinaison méiotique du blé tendre. Cela implique d'étudier les événements de recombinaison dans une descendance biparentale (50, 55). Sans l'utilisation d'embryons hybrides nous aurions dans un premier temps dû produire des embryons provenant du génotype transformable Courtot, les transformer, attendre que les plantules transformées (en faible nombre très probablement) atteignent le stade de floraison pour ensuite les croiser avec le génotype Chinese Spring. Enfin il aurait fallu semer cette descendance F1 et attendre la production des grains F2 sur lesquels aurait été étudiée la recombinaison. Ici la capacité de pouvoir transformer directement une population F1 nous fait gagner l'équivalent de la durée nécessaire à une génération de blé tendre (à minima 6 mois) et de pouvoir utiliser le génotype de notre choix sans se soucier de sa transformabilité (ici Chinese Spring, génotype pour lequel sont développées les principales ressources génétiques disponibles à ce jour). Cet avantage nous permet d'économiser un tiers du temps nécessaire à l'étude de l'impact de différentes versions de la biotechnologie SpiX sur la recombinaison du blé tendre.

Le taux général de transformation observé durant ce travail de thèse (0,7%) est significativement différent du taux attendu pour cet hybride (p-value = 0,0006) (281). Quelques 21910 embryons ont été transformés au cours du projet de thèse dont environ 28% durant la période allant de mars à juillet. Cette période est particulièrement favorable au développement de maladies telle que l'oïdium (304) à cause principalement de l'augmentation de l'humidité en serre, facteur favorable à la germination et à l'infestation de la plante par le champignon responsable de l'oïdium, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Cette période est aussi favorable à l'infestation des plantes par des parasites tels que les Trips, se nourrissant de pollen et responsables de piqûres dans les grains en formation (*Thysanoptera*) (293). La combinaison des deux favorise l'introduction de spores de *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* à l'intérieur des grains immatures. Nous ne pouvons seulement stériliser les grains immatures qu'en surface et par conséquent les spores qui se retrouvent à l'intérieur ne seront pas détruits et vont se retrouver sur l'embryon extrait et ainsi contaminer celui-ci et le milieu de culture. Il est même arrivé que malgré la conservation des grains immatures au froid, un développement de mycélium a été observé dans les tubes de conservation sur les grains immatures. De nombreux lots de grains immatures et d'embryons sur milieu plasmolysant ont ainsi été perdus dû à des contaminations par des champignons. Ceci pourrait expliquer le faible taux de transformation observé dans ce travail. Malgré tous les efforts entrepris pour contrôler les infestations de maladies et de parasites en serre, il reste très difficile de vérifier l'état sanitaire des grains immatures pour éviter toutes contaminations postérieures.

Nous avons observé aussi que nous avons beaucoup de perte entre le passage du deuxième au troisième milieu de sélection. L'explication la plus probable serait la vigueur hybride engendrée par le croisement entre CS et Ct qui rendrait les plantules plus vigoureuses sur les premiers milieux de sélection et notamment sur PMI2, où la sélection se retrouve réduite pour permettre aux jeunes

plantules en cours de régénération de pouvoir développer leurs parties aériennes (et aussi racinaires) sans pression de sélection.

Enfin, environ 2% de stérilité a été observée chez les plantes transgéniques cultivées en serre OGM. Ceci est probablement la conséquence du protocole de biolistique. En effet lors d'une transformation par biolistique, de nombreuses mutations ou variations somaclonales peuvent avoir lieu (305) et il est possibles que celles-ci, dans certains cas, touchent des gènes essentiels et induisent de la stérilité.

5.2 SPO11 chez le blé tendre

5.2.1 Orthologie

Les études génétiques que nous avons menées sur le génome du blé et sur les orthologues des gènes Spo11-1 et Spo11-2 d'*Arabidopsis thaliana*, nous ont permis de retrouver ceux-ci sur les chromosomes des groupes 5 et 7, respectivement, chez le blé tendre. Chacun des deux gènes a été retrouvé à chaque fois sur les 3 sous-génomes du blé tendre, A, B et D. Chez le blé tendre 55% des groupes d'homéologie sont composés de trois copies répartie sur les 3 sous-génomes (266), il n'est donc pas surprenant que Spo11-1 et Spo11-2 en fassent partie. Lloyd *et al.* en 2014 (306) montrent que les gènes impliqués dans la recombinaison méiotique ont tendance à retourner plus vite à l'état simple copie que les autres gènes du génome. Cependant ils montrent aussi que dans les polyploïdes récents comme le blé tendre, en analysant 19 gènes impliqués dans la recombinaison méiotique, ceux-ci sont toujours présents en trois copies homéologues et que globalement toutes les copies sont exprimées de façon équivalente. Nos résultats sont donc en accord avec les leurs, puisque nous retrouvons bien trois copies pour les deux gènes.

Chez le blé tendre, des études d'orthologie avec *Arabidopsis thaliana* montrent que certains gènes ont en moyenne une similarité de 80% (307–309). Des études impliquant d'autres céréales, comme le riz, montrent qu'en général, entre *Arabidopsis* et céréales, le pourcentage d'identité varie de 30 à 100% (310, 311). Ici les deux gènes que nous étudions montrent une similitude à hauteur de 55% en moyenne avec leurs orthologues chez *Arabidopsis thaliana*. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Sprink et Hartung en 2014 (206). Ils montrent que l'identité des orthologues pour le gène SPO11-1 d'*Arabidopsis* va de 95.5% pour *Arabidopsis lyrata*, une espèce proche, à 45.5% pour *Physcomitrella patens*, une bryophyte, phylogénétiquement éloignée. Il en va de même pour SPO11-2. Avec 55%, nous nous situons dans cet intervalle, considérant la perte de 10% de

similarité qu'ils identifient entre les monocotylédones et les dicotylédones, représentant la séparation ancienne de ces deux classes phylogénétiques.

Ces résultats tendent à confirmer le fait que ces deux gènes et leurs fonctions sont fortement conservés au sein des plantes (204, 272).

5.2.2 Complémentation hétérologue et conservation de fonction

La complémentation génétique est utilisée depuis le début des années 1950 afin de pouvoir valider la fonction d'un gène dans un contexte mutant pour ce gène et dans une multitude d'organisme animaux et végétaux (312–316). Plus récemment, des expériences de complémentation inter-espèces ont été menées chez les animaux (317, 318) et les champignons (319) pour la validation de la fonction d'un gène entre différentes espèces.

Chez *Arabidopsis thaliana*, cette technique est couramment utilisée pour la validation fonctionnelle de gènes en complétant avec des gènes provenant d'*Arabidopsis* même (68, 320–323) mais aussi avec des gènes d'autres espèces. Gomez et Chrispeels en 1994 (324) ont restauré avec succès un phénotype mutant d'*Arabidopsis thaliana* avec un cDNA humain codant pour une N-acetylglucosaminyltransferase I malgré une expression de la protéine humaine bien plus faible (environ 10%) que celle de la protéine endogène d'*Arabidopsis* et une grande distance évolutive entre les deux espèces. Quelques exemples de complémentations hétérologues ont été réalisés entre plantes supérieures. En 2001, Dong (325) a réalisé la complémentation de plusieurs mutants d'*Arabidopsis thaliana* avec les gènes orthologues du maïs. Chez *Arabidopsis*, trois locus, TT4 (Transparent Testa 4), TT5 et TT3 ont été identifiés comme responsables de la pigmentation de l'enveloppe de la graine et portant respectivement les gènes codant pour les protéines CHS (Chalcone Synthase), CHI (Chalcone Isomerase) et DFR (DihydroFlavonol 4-Reductase). Chez le

maïs, les orthologues sont les gènes C2, Chi1 et A1, respectivement, codant pour les protéines C2, CHI1 et A1. La protéine C2 a une similarité de 89% avec la protéine CHS alors que les protéines CHI1 et A1 ont une similarité de 58 et 59% respectivement avec les protéines CHI et DFR. Les trois mutants *Arabidopsis* tt4, tt5 et tt3 ont été parfaitement complétés avec les gènes de maïs correspondant à chaque locus, respectivement C2, Chi1 et A1 montrant ainsi que des gènes orthologues codant pour des enzymes impliquées dans l'accumulation de métabolites secondaires sont transférables entre plantes supérieures éloignées au niveau phylogénétique. Ce travail montre aussi que malgré un niveau de similarité moyen (autour de 60%) une complémentation hétérologue est possible. Cependant les gènes étudiés ci-dessus ne sont pas impliqués dans des mécanismes fondamentaux comme la méiose, impactant la pérennité de l'espèce.

Nos résultats montrent que les gènes Spo11-1 et Spo11-2 présentent des similarités allant de 55 à 66%, respectivement, entre le blé tendre et *Arabidopsis thaliana* et que le taux de complémentation de la fécondité atteint un maximum de 70% à 100%, respectivement, pour la complémentation des mutants *spo11-1* et *spo11-2* d'*Arabidopsis*. Nos résultats sont donc en adéquation avec les résultats de la littérature dans le cas d'une complémentation hétérologues (325) et impliquent que les domaines conservés entre les deux espèces semblent suffisants pour l'interaction entre SPO11-1 et SPO11-2, mais aussi avec l'ADN et avec le troisième membre de ce complexe, MTOPVIB (276, 326). Des expériences de complémentation pour ce troisième membre ainsi que la complémentation du triple mutant pourraient fournir des informations sur le complexe SPO11-1/SPO11-2/MTOPVIB et sur le fait qu'il pourrait s'agir du complexe protéique minimal requis pour la formation de CDB méiotique. La présence de chiasmas indique qu'une recombinaison homologue a lieu chez les plantes exprimant TaSPO11-1-5D et que, par conséquent, des CDB se forment dans les lignées transgéniques. Il faudrait alors confirmer la capacité de TaSPO11-1-5D à

former des CDB dans des cellules méiotiques en effectuant une immuno-localisation de la protéine RAD51 (117, 251).

Ces résultats fournissent une nouvelle vision de la complémentation hétérologue et un nouvel horizon potentiel pour la validation fonctionnelle de gènes chez les plantes supérieures. Cette technique pourrait être utilisée, par exemple, pour la validation de gènes d'espèces de grandes cultures, difficiles à transformer, et ayant des génomes complexes ou polyploïdes à partir desquels il est difficile de générer des mutants KO. Cette technique pourrait aussi être utilisée dans l'optique de la création de mutants hypomorphes qui dans le cas de l'étude et de la manipulation de la recombinaison méiotique permettrait de travailler dans un contexte où le gène « endogène » (il s'agirait alors dans ce cas du gène servant à la complémentation du mutant KO pour ce même gène) aurait une expression réduite au maximum, permettant tout de même d'effectuer une méiose correcte et d'éviter la stérilité, phénotype récurrent des mutants pour les principaux gènes de la recombinaison méiotique chez *Arabidopsis thaliana* (97, 117, 205, 208, 209, 251, 271, 276, 327)

5.2.3 Epissage alternatif

Au début de ce travail de thèse nous avons décidé de conserver les deux premiers introns des gènes Spo11-1 et Spo11-2 pour la technologie SpiX en vertu du fait que ceux-ci pouvaient avoir une fonction régulatrice de l'expression de ces gènes. Depuis longtemps il est connu que les introns jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes chez la souris (328) mais aussi chez les plantes et d'autres organismes, notamment dans le cas d'expression de gènes transgéniques chez les plantes (329). Chez la levure, peu de gènes possèdent des introns (4%) et encore moins subissent un épissage alternatif (330). Le gène Spo11 de la levure fait partie de la majorité des gènes ne possédant pas d'intron et la construction SpiX réalisée chez la levure comportait alors le gène

Spo11 sans intron et celle-ci s'est avérée efficace (200). Notre démarche chez le blé se voulait cependant précautionneuse pour maximiser nos chances d'avoir une expression correcte des gènes Spo11-1 et Spo11-2 dans la construction SpiX. Nous nous sommes malheureusement rendu compte alors que l'intron 1 était parfaitement épissé, mais pas l'intron 2, dans les feuilles du moins, conduisant dans les deux cas *in silico* à une protéine tronquée non fonctionnelle. Il pourrait s'agir là d'un épissage alternatif qui n'aurait lieu que dans les feuilles.

L'épissage alternatif est un mécanisme très répandu au sein des eucaryotes pluricellulaires pour augmenter la complexité de l'expression des gènes qui jouent un rôle très important dans la différenciation cellulaire et le développement des organismes (331). Chez l'homme en revanche, alors que le nombre de gènes codant pour une protéine est d'environ 25000, le nombre de protéines générées est supérieur à 90000 (332), rendant alors obsolète l'idée originelle d'1 gène = 1 ARN = 1 protéine. De cette manière, 95% des gènes humains subissent un épissage alternatif (333). A l'inverse de l'épissage constitutif qui est l'épissage de tous les introns et la ligation de tous les exons dans l'ordre dans lequel ils apparaissent dans le gène, l'épissage alternatif consiste en l'exclusion de certains exons (38%), le changement des bornes 3' et/ou 5' des introns (26%) et la rétention de certains introns (3%) (334). Chez les plantes, l'épissage alternatif est aussi très répandu pour l'adaptation et la réponse de celles-ci à leur environnement avec environ 60% des gènes identifiés pour l'instant comme étant soumis à ce mécanisme (335–338).

Des analyses des séquences codantes pour les gènes Spo11-1 et Spo11-2 ainsi que les différentes formes d'épissage ont été conduites chez *Arabidopsis*, *Brassica rapa*, la papaye, le riz et la mousse (206). Un épissage alternatif a été observé chez toutes ces espèces, conduisant à des isoformes non fonctionnelles en raison de la rétention des introns ou à la réduction des exons, entraînant des codons stop prématurés dus au décalage du cadre de lecture. Nous avons tenté de réaliser ce travail pour le gène Spo11-1 copie 5DL à partir des bases de données ARN disponibles pour le blé au

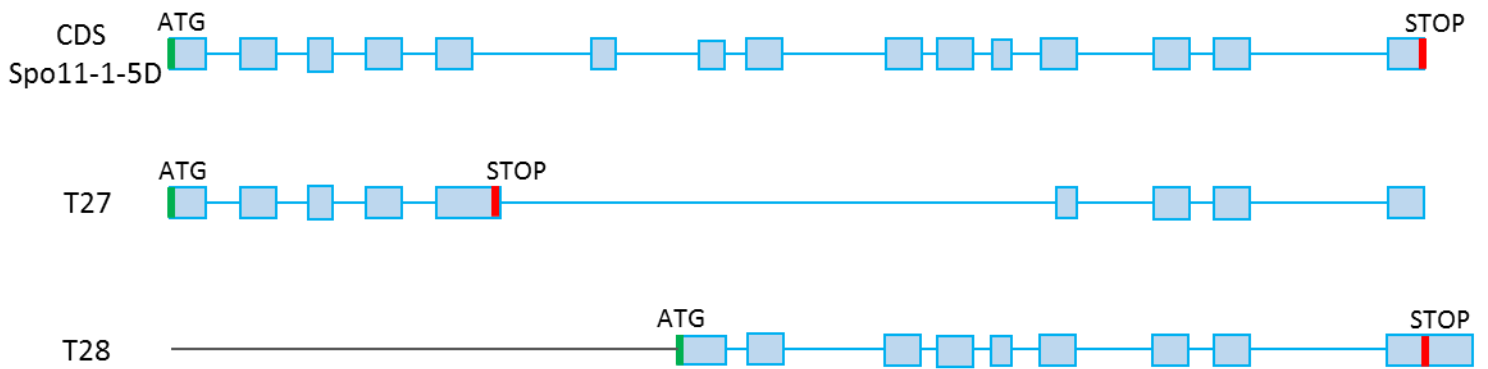


Figure 65 : Analyse des transcrits pour le gènes Spo11-1 copie D. Les transcrits issus d'une base de données RNAseq disponible au laboratoire et correspondant au gène Spo11-1 copie D ont été alignés sur le CDS du gène. Les exons putatifs sont matérialisés par les rectangles bleus et les introns par les lignes les reliant. Les ATG sont représentés par les traits verts et les codon STOP par les traits rouges.

stade méiose mais il nous a été impossible de retrouver la version entière pleinement épissée pour ce gène (Figure 65). Seules deux formes très partielles ont été retrouvées, présentant une délétion de plusieurs exons soit au milieu soit en partie 5'. Ces deux formes ne correspondent pas à une version où l'intron 1 serait présent et pas l'intron 2. Il se pourrait alors que la rétention de l'intron 2 que nous observons dans le cas de notre première construction SpiX comportant les introns soit dû à un autre mécanisme comme par exemple un signal d'épissage présent dans un autre intron que nous n'avons pas conservé.

Les résultats de complémentation chez *Arabidopsis* nous confirmant que la version ADNc du gène Spo11-1 est fonctionnelle, celle-ci est donc à privilégier. Une autre alternative serait d'utiliser la version génomique du gène comportant tous les introns. Dans la littérature, pour la complémentation de mutants d'*Arabidopsis thaliana*, les chercheurs utilisent soit l'une soit l'autre des deux formes (ADNc et génomique) (117, 339, 340) sans préférence particulière. L'intérêt d'utiliser la version génomique du gène est de laisser le choix à la plante dans l'épissage de celui-ci. L'utilisation du gène Spo11-2 peut aussi être envisagée, soit sous la forme cDNA, soit sous la forme génomique

5.3 Application et efficacité de la technologie SpiX chez le blé

tendre

5.3.1 Les cibles

L'analyse des zones cibles déterminées *in silico* révèle que celles-ci ne présentent à la fois aucune différence et aucune similitude flagrante. Elles sont naturellement toutes localisées dans des promoteurs étant donné que les séquences de départ dans lesquelles elles ont été dessinées sont des régions promotrices de gènes. De plus, elles ont toutes une composition en nucléotides similaire mais ne possèdent pas de domaines conservés entre elles. La détermination des cibles TAL et CRISPR s'est faite sans *a priori* et uniquement en fonction des prérequis existant pour le bon fonctionnement de ces systèmes de liaison à l'ADN. Seul varie leur emplacement le long du chromosome 3B et par extension le paysage génétique dans lequel elles se retrouvent, il faudrait alors observer celui-ci à bien plus grande échelle pour ainsi identifier de potentiels groupes de cibles en fonction du paysage génomique.

5.3.2 Le ciblage

Comme moyen de ciblage de l'ADN nous avons d'abord choisi les TAL, grosses protéines construites à façon et ciblant une région précise et prédéterminée de l'ADN (163, 341). Les TAL ont par ailleurs déjà montré leur efficacité chez les plantes (189) et ont été utilisés par exemple dans le projet ANR GENIUS (Pierre Barret, Communication personnelle). Cependant elles ne sont pas infaillibles et présentent une sensibilité à la méthylation et notamment, il a été montré que ces domaines de liaison à l'ADN sont sensibles à la présence d'une 5-méthylcytosine (342), une forme de cytosine méthylée, souvent considérée comme la cinquième base de l'ADN et très présente dans

les îlots CpG des promoteurs des gènes (343), régions que nous ciblons préférentiellement dans ce travail.

Valton *et al.* en 2012 (190) ont mis en place plusieurs méthodes sur culture de cellules humaines pour évaluer la fixation et l'activité de protéines TAL en présence de méthylation et trouver un moyen de contourner cette difficulté. Pour suivre l'activité des protéines TAL, ils suivent l'apparition de mutations dans les séquence ADN des cellules transfectées avec les différentes constructions qu'ils ont élaborées. Dans notre cas, ceci est impossible puisque les protéines TAL que nous utilisons sont couplées aux protéines SPO11-1 ou SPO11-2 et non à une endonucléase capable de couper et d'induire des mutations. Ils ont aussi à leur disposition une base de données « méthylome » chez l'homme, base de données qui n'est pas disponible pour le blé tendre avec une précision qui nous permettrait de connaître l'état de méthylation des cytosines au sein de nos cibles. Un des moyens pour tester si la méthylation de l'ADN a un impact significatif sur la fixation des TAL sur l'ADN qu'ils utilisent, est un test de fixation *in vitro* de type interaction ADN-protéine. Dans notre cas, nous pourrions réaliser un test de retard sur gel comme effectué déjà lors de ce travail de thèse mais cette fois-ci avec des sondes méthylées artificiellement. Bien évidemment ceci reste un test *in vitro* et ne fournira que quelques indices de ce qu'il se passe *in vivo*. La technologie Sun-Tag qui consiste en la fixation d'un tag fluorescent à une protéine d'intérêt pourrait nous permettre d'observer si la technologie SpiX avec une protéine TAL comme système de liaison à l'ADN forme des foci dans les noyaux au niveau de la molécule d'ADN.

Les TAL ont été efficacement utilisés chez le blé tendre pour l'édition des génomes (344). Wang *et al.* en 2014 (189) ont réussi l'édition des trois copie homéologues du gène TaMLO grâce aux TAL couplés à une endonucléase. Cependant, les domaines TAL sont de très grosses protéines qui restent très cher à produire, et qui demandent d'être resynthétisées si l'on veut changer de cible. D'un autre coté la technologie CRISPR/CAS9 est décrite comme étant beaucoup moins sensible

aux modifications épigénétiques et beaucoup moins cher à utiliser, les guides ARN étant le seul élément à modifier à façon pour correspondre à la cible choisie. Wang *et al* en 2014 (189) ont utilisé avec succès la technologie CRISPR/CAS9 chez le blé tendre pour éditer la copie portée par le génome A du gène TaMIO. Leur cible CRISPR a été dessinée au sein de leur cible TAL, avec une longueur de 20pb et un pourcentage en GC de 60%. Depuis, d'autres cibles ont été utilisées avec succès (198) dont la cible GASR7 dans le gène TaGasr7, que nous avons utilisé dans ce travail pour élaborer une population SpiX de secours dans le cas d'une défaillance des 6 autres cibles CRISPR. Ces cibles que nous avons dessinées pour la construction dCAS9-cSPO11-1 respectent exactement les caractéristiques des cibles publiées (189, 198) avec une longueur de 20pb et une teneur moyenne de 65% en GC. De plus cette technologie permettrait de cibler plusieurs sites simultanément dans la même plante et ainsi dans un contexte mutant spo11, nous pourrions nous retrouver dans la capacité de faire des CDB où l'on souhaite et à un niveau au moins équivalent au nombre de CO par chromosome observé dans des plantes sauvages.

Dans ce travail doctoral, nous travaillons en contexte sauvage où agissent les protéines endogènes SPO11-1 et SPO11-2. Le fait de travailler en contexte sauvage peut avoir un impact sur la technologie SpiX qui rentre alors en compétition directe avec ces protéines endogènes. Ceci est un biais non négligeable dans le sens où les expérimentations de modification de la recombinaison par la technologie SpiX s'apparentent à de la complémentation fonctionnelle, puisque nous voulons que le système SpiX prenne le pas sur la machinerie endogène de cassures double-brins. Dans la littérature toutes les études de complémentation, comme chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, se font dans un contexte mutant. L'obtention de mutants KO chez le blé tendre est fastidieuse et incertaine, nécessitant de nombreux croisements pour réunir dans une même lignée les trois copies mutées d'un gène. De plus, nous travaillons sur des gènes dont la version mutée induit une stérilité

qui implique de conserver une copie du gène à l'état hétérozygote afin de pouvoir obtenir une descendance étudiable. Néanmoins, l'efficacité de la technologie CRISPR/CAS9 redonne de l'espoir dans l'obtention rapide et efficace d'un mutant KO ou hypomorphe. De plus, des études récentes menées au sein du laboratoire montrent que la copie du gène Spo11-2 portée par le génome A est non fonctionnelle, le double mutant copie B/copie D étant stérile (nos résultats non publiés). Dès lors, l'obtention d'un mutant pour ce gène est facilitée et permet ainsi de travailler en contexte mutant avec la technologie SpiX, faisant intervenir par conséquence la protéine SPO11-2.

5.3.3 Le promoteur UBI

Le promoteur du gène Ubiquitine 1 de maïs couplé au premier intron de ce même gène, communément appelé promoteur UBI, a longtemps été utilisé en transgénèse chez les plantes pour l'expression forte et constitutive de transgènes (260, 345, 346). Chez le blé tendre, ce promoteur est aussi utilisé depuis longtemps et il a été démontré que celui-ci a en général une forte activité dans les tissus jeunes et métaboliquement actifs ainsi que dans les grains de pollen (280). Depuis, le promoteur UBI est couramment utilisé chez le blé tendre pour l'expression de transgènes, à l'instar des travaux cités dans le chapitre précédent (189, 198, 279). Dans le cadre du projet développé autour de la biotechnologie SpiX, ce promoteur est également utilisé dans les versions des constructions SpiX pour le Riz et le Maïs (Emmanuel Guiderdoni, Ian Fayos, Peter Rogowsky, communications personnelles). Cependant chez le riz, le promoteur UBI, bien que globalement exprimé dans la plupart des tissus, présente des variations importantes dans son activité durant le développement de la plante (346). Le même phénomène est observé chez le blé (280). Nous avons donc dû confirmer l'activité de ce promoteur dans les anthères d'une lignée de blé tendre exprimant constitutivement le gène rapporteur GUS sous le contrôle de promoteur UBI.

Néanmoins, dans l'expérience de complémentation hétérologue chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons utilisé le promoteur Rad51 du gène méiotique d'*Arabidopsis thaliana* ayant déjà prouvé son efficacité (117) (Olivier Da Ines, communication personnelle) pour l'expression efficace de gènes méiotiques, dans le temps et dans l'espace. Au sein des projets SpiX chez le riz et le maïs, les promoteurs endogènes des gènes Spo11-1 et Spo11-2 sont aussi utilisés pour les constructions SpiX, avec notamment un franc succès du promoteur putatif du gène Spo11-1 de maïs pour la complémentation d'un mutant de maïs sur ce même gène avec la construction SpiX TAL-SPO11-1 (Peter Rogowsky, communication personnelle). Celui-ci correspond à 1.27kb en amont de l'ATG du gène Spo11-1 de maïs, comprenant le dernier intron, le dernier exon et la partie 3'UTR du gène précédent, et la région intergénique. Chez *Arabidopsis thaliana*, le promoteur endogène de Spo11-1 est aussi utilisé (Ian Henderson, communication personnelle). Chez le blé tendre, nous avons choisi de ne pas utiliser les promoteurs propres aux gènes Spo11-1 et Spo11-2 car la définition des bornes chez le blé n'a pas encore été faite et semblait hasardeuse. Malgré le bon fonctionnement du promoteur UBI, l'utilisation du promoteur endogène des gènes Spo11-1 et Spo11-2 pourrait aussi être envisagée pour une expression de la biotechnologie SpiX plus précise dans le temps et dans l'espace. A cette fin, les promoteurs putatifs des 3 copies de chacun des deux gènes ont été isolés de la même manière que chez le maïs et celui correspondant à la copie D du gène Spo11-1 a été synthétisé afin d'être utilisé dans la réalisation de nouvelles constructions SpiX en cas d'échec de la dernière tentative avec la construction dCAS9-cSPO11-1 sous le contrôle du promoteur UBI.

5.3.4 Génotypage des populations T1 SpiX

Tout d'abord nous avons remarqué que les régions comportant les cibles 15-412 et 47-133 présentaient peu ou pas de polymorphisme entre les deux parents, Chinese Spring et Courtot. Une

explication viendrait du fait que chez Courtot, ces régions sont au sein d'introgessions provenant du génotype asiatique Norin10, le rendant alors très proche du génotype asiatique Chinese Spring. Nous ne disposons pas de ces informations lors du choix et du dessin des cibles TAL et nous nous basions sur l'origine géographique différentes des deux génotypes parents pour la présence hypothétique de SNP encadrant ces cibles.

Ensuite, les résultats de génotypage sur les populations T1 SpiX montrent que pour l'instant la technologie SpiX dans sa forme actuelle (UBI::TAL-cSPO11-1) ne permet pas de modifier le niveau de recombinaison méiotique au niveau de la cible étudiée (28-626), à l'inverse de ce qui a été obtenu chez la levure (200). En revanche, nous sommes en adéquation avec les résultats observés pour l'instant chez le maïs et le riz (Emmanuel Guiderdoni, Ian Fayos, Peter Rogowsky, communications personnelles). Nos résultats montrent aussi que lorsque l'on élargit la région à génotyper afin de détecter des recombinants naturels, nous sommes confrontés à une forte disparité dans le nombre de recombinants naturels entre sous-populations d'une même population T1 et entre les populations T1. Par exemple, dans la population T1 témoin ne portant que le gène de sélection, une grande disparité est observée entre les sous-populations issus de plantes différentes. Il est néanmoins utile de prendre en compte toutes les sous-populations pour tamponner cette disparité et ainsi éviter d'introduire un biais dans le nombre théorique de recombinants naturels. Nos résultats ne permettent pas pour l'instant d'infirmer ou d'affirmer l'efficacité de la biotechnologie SpiX chez le blé tendre, il reste encore des populations T1 à analyser pour d'autres cibles et d'autres formes de la construction SpiX (dCAS9-cSPO11-1).

D'un autre côté, nos résultats montrent que la technique KASPar employée jusqu'à lors est efficace et permet d'obtenir les données nécessaires pour estimer l'efficacité de la biotechnologie SpiX. Elle reste néanmoins cantonnée à l'analyse de quelques centaines d'individus par population, et l'augmentation du nombre d'individus représente un investissement en temps non négligeable. Une

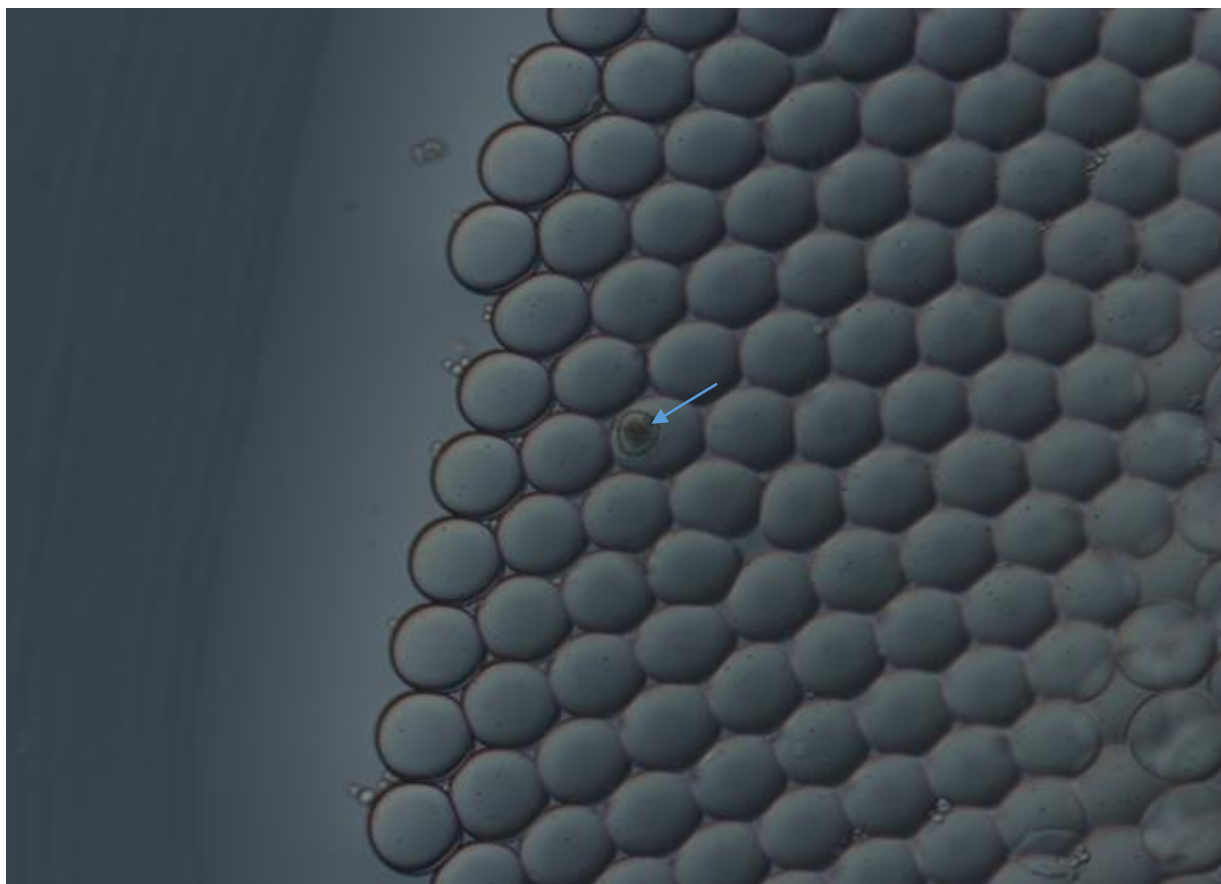


Figure 66 : Pollen typing par ddPCR. Observation au microscope de micro gouttelettes suite à l'émulsion d'un mélange réactionnel contenant des grains de pollen grâce au Droplet Generator QX200 de Bio-Rad. La flèche bleue indique un grain de pollen à l'intérieur d'une micro gouttelette.

alternative intéressante serait d'arriver à génotyper les grains de pollen eux-mêmes et de façon automatisée. Il existe déjà plusieurs techniques dans ce sens. Une première, faisant intervenir l'extraction d'ADN de grains de pollen (62), risque de voir les deux marqueurs distants de plusieurs centaines de kilobases dissociés et répartis de manière aléatoire dans les puits. Une deuxième consiste à isoler des noyaux de grains de pollen dans chaque puits grâce à un cytomètre en flux suivie d'une amplification du génome entier pour pouvoir ensuite réaliser un test KASPar (347). Bien qu'évitant de dissocier les deux marqueurs, cette technique revient au même que celle employée dans ce travail de thèse en terme de nombre d'échantillons traités. Lors de ce travail de thèse, nous avons commencé à développer une technique de double génotypage des grains de pollen en PCR digitale en microgouttelette (ou digital droplets PCR, ddPCR). Des premiers résultats prometteurs d'intégration des grains de pollen dans des microgouttelettes ont été obtenus sur un appareil QX200 de chez BioRad (Figure 66). Il reste maintenant à réussir à mener à bien le génotypage de ces grains de pollen individualisés.





CONCLUSION

6 CONCLUSION

Au cours de ce stage doctoral, j'ai pu affiner les conditions d'utilisation de la biotechnologie SpiX chez le blé tendre. Nous savons maintenant qu'il faut utiliser soit le gène Spo11-1 ou Spo11-2 sous leur forme cDNA en priorité et théoriquement sous leur forme génomique. La fonctionnalité de la version cDNA de Spo11-1 a d'ailleurs été validée par complémentation hétérologue d'un mutant spo11-1 d'*Arabidopsis*. Nous savons aussi maintenant que les protéines TAL ne sont pas idéales pour le ciblage à l'ADN et la mise en place routinière de la biotechnologie SpiX malgré leur efficacité démontrée par le passé, principalement dû à leur coût et à leur sensibilité aux modifications épigénétiques. Il sera préférable d'utiliser des systèmes moins chers, moins sensibles et plus flexibles comme les CRISPR/CAS9. Pour le moment nous ne savons pas encore si la cible peut se situer n'importe où sur le génome. Bien évidemment nous avons choisi de cibler des promoteurs de gènes mais à la fois dans des régions non recombinantes et faiblement recombinantes. Cependant, nous ne savons pas encore l'impact du niveau initial de recombinaison sur l'efficacité de la biotechnologie SpiX. Les résultats qui seront obtenus avec les guides CRISPR dessinés sur les deux types de régions devraient nous apporter une réponse claire à ce sujet.

La réussite de la mise au point de cette biotechnologie chez le blé tendre serait un pas de plus vers le déverrouillage des liaisons négatives entre les gènes qui sont un des freins actuels dans l'amélioration variétale chez le blé tendre. De nombreuses études font état de liaisons négatives associant des gènes de résistance biotiques à un défaut de rendement (348). Par exemple le gène Pch1 de résistance au piétin-verse ayant été introduit dans des lignées élite de blé, et provenant d'une portion génique d'*Aegilops ventricosa* transloquée au niveau du chromosome 7D, est toujours fortement lié à un défaut de rendement et de qualité. Il s'agit ici d'un exemple flagrant de liaisons négative. Cependant, après de multiples développements variétaux (au moins 4 à la suite),

quelques variétés ont été obtenues, portant le gène et ayant un rendement compétitif, sans savoir s'il y a eu recombinaison au niveau de ce gène, rompant la liaison négative. Un deuxième exemple est celui du gène Pm16, un gène de résistance à l'oïdium introgressé depuis *Aegilops speltaoides* sur le chromosome 5B, qui est associé à un défaut de rendement encore plus important que pour Pch1. En moyenne, le rendement est diminué de 15% dans les lignées portant ce gène (348). Il est fort probable que ce gène soit négativement lié à d'autres gènes qui auraient un effet négatif sur le rendement. Bien sûr d'autres espèces présentent un phénomène similaire. L'orge, une espèce apparentée au blé tendre, peut posséder une résistance à l'oïdium grâce au gène Mlo qui confère aussi une sensibilité accrue aux maladies nécrotrophes et hémibiotrophes (349). Les technologies d'édition des génomes telles que CRISPR/CAS9 pourraient être une alternative afin de modifier le gène dit « négatif ». Mais ceci implique de connaître à la fois le gène d'intérêt mais aussi le ou les autres gènes ayant un potentiel effet délétère. Cloner un gène est déjà en soi un exercice complexe et il le sera d'autant plus s'il y a deux gènes. De plus, il existe sûrement des cas où l'édition sera compliquée dans le cas où le gène à éditer fait partie d'une famille multigénique, ou que l'effet négatif est porté par un cluster de centaines de gènes (comme les gènes codant pour les gluténines chez le blé tendre) (350–353). Il paraît donc plus simple de rompre la liaison négative. La biotechnologie SpiX peut apporter une réponse simple et efficace pour permettre la recombinaison ciblée aux abords de gènes d'intérêt agronomique et ainsi permettre de débloquent la stagnation du potentiel génétique observée depuis quelques années dans la création variétale chez le blé tendre. Pour ceci il est nécessaire de mieux connaître et contrôler les acteurs intervenant dans cette biotechnologie et les mécanismes fins de la méiose chez le blé tendre. L'obtention de nouvelles variétés de blé tendre capables de faire face aux nouveaux enjeux sociétaux, économiques et climatiques, est étroitement liée à cette problématique pour l'introgession d'allèles nouveaux et performants issus de variétés exotiques apparentées. Les résultats obtenus lors de mon travail de

thèse ont permis de défricher une première partie des conditions d'utilisation et d'application de la biotechnologie SpiX chez le blé tendre, mais aussi d'apporter une pierre à l'édifice pour la compréhension générale de la recombinaison méiotique.

7 REFERENCES

1. J. Diamond, Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*. **418**, 700–707 (2002).
2. J. Ross-Ibarra, P. L. Morrell, B. S. Gaut, Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8641–8648 (2007).
3. R. S. Meyer, M. D. Purugganan, Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 840–852 (2013).
4. Y. Matsuoka, Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiol.* **52**, 750–764 (2011).
5. S. Renny-Byfield, J. F. Wendel, Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *Am. J. Bot.* **101**, 1711–1725 (2014).
6. L. Cui, Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* **16**, 738–749 (2006).
7. J. F. Doebley, B. S. Gaut, B. D. Smith, The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell.* **127**, 1309–1321 (2006).
8. J. H. Peng, D. Sun, E. Nevo, Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol. Breed.* **28**, 281–301 (2011).
9. Y.-B. Fu, Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. *Theor. Appl. Genet.* **128**, 2131–2142 (2015).
10. A. Fita, A. Rodríguez-Burruezo, M. Boscaiu, J. Prohens, O. Vicente, Breeding and Domesticating Crops Adapted to Drought and Salinity: A New Paradigm for Increasing Food Production. *Front. Plant Sci.* **6** (2015), doi:10.3389/fpls.2015.00978.

11. M. A. Ramesh, S.-B. Malik, J. M. Logsdon, A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes. *Curr. Biol.* **15**, 185–191 (2005).
12. A. M. Villeneuve, K. J. Hillers, Whence Meiosis ? Minireview. *Cell.* **106**, 647–650 (2001).
13. J. L. Gerton, R. S. Hawley, Homologous chromosome interactions in meiosis: Diversity amidst conservation. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 477–487 (2005).
14. H. B. Creighton, B. McClintock, A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in Zea Mays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **17**, 492–7 (1931).
15. J. PELLICER, M. F. FAY, I. J. LEITCH, The largest eukaryotic genome of them all? *Bot. J. Linn. Soc.* **164**, 10–15 (2010).
16. M. L. H. Kaul, T. G. K. Murthy, Mutant genes affecting higher plant meiosis. *Theor. Appl. Genet.* **70**, 449–466 (1985).
17. J. W. Szostak, T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, F. W. Stahl, The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* **33**, 25–35 (1983).
18. G. A. Cromie, G. R. Smith, Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol.* **17**, 448–455 (2007).
19. S. Keeney, Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn. Stab.* **11**, 27–68 (2007).
20. R. Holliday, Mechanism of gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**, 282–304 (1964).
21. R. Mercier, C. Mézard, E. Jenczewski, N. Macaisne, M. Grelon, The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 297–327 (2015).
22. L. Berchowitz, G. Copenhaver, Genetic Interference: Dont Stand So Close to Me. *Curr. Genomics.* **11**, 91–102 (2010).
23. L. Zhang *et al.*, Topoisomerase II mediates meiotic crossover interference. *Nature.* **511**, 551–556 (2014).

24. E. J. Louis, R. H. Borts, Meiotic Recombination: Too Much of a Good Thing? *Curr. Biol.* **13**, R953–R955 (2003).
25. W. Crismani *et al.*, FANCM Limits Meiotic Crossovers. *Science (80-.)*. **336**, 1588–1590 (2012).
26. S. Lu *et al.*, Probing Meiotic Recombination and Aneuploidy of Single Sperm Cells by Whole-Genome Sequencing. *Science (80-.)*. **338**, 1627–1630 (2012).
27. E. Wijnker, A. Schnittger, Control of the meiotic cell division program in plants. *Plant Reprod.* **26**, 143–158 (2013).
28. H. Khademian, L. Giraut, J. Drouaud, C. Mézard, W. P. Pawlowski, M. Grelon, S. Armstrong, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2013; <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-333-6>), vol. 990 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 177–190.
29. M. Cifuentes, M. Rivard, L. Pereira, L. Chelysheva, R. Mercier, Haploid Meiosis in Arabidopsis: Double-Strand Breaks Are Formed and Repaired but Without Synapsis and Crossovers. *PLoS One.* **8**, 1–12 (2013).
30. S. Burma, B. P. C. Chen, D. J. Chen, Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. **5**, 1042–1048 (2006).
31. A. F. A. Smit, Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1863–1872 (1993).
32. S. Myers, A Fine-Scale Map of Recombination Rates and Hotspots Across the Human Genome. *Science (80-.)*. **310**, 321–324 (2005).
33. S. Myers, C. Freeman, A. Auton, P. Donnelly, G. McVean, A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat. Genet.* **40**, 1124–1129 (2008).
34. J. K. Pace, C. Feschotte, The evolutionary history of human DNA transposons: Evidence

- for intense activity in the primate lineage. *Genome Res.* **17**, 422–432 (2007).
35. F. Baudat *et al.*, PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science (80-.)*. **327**, 836–840 (2010).
 36. V. Borde, B. de Massy, Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: Setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 147–155 (2013).
 37. B. de Massy, Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 563–599 (2013).
 38. L. Zhang, H. Ma, Complex evolutionary history and diverse domain organization of SET proteins suggest divergent regulatory interactions. *New Phytol.* **195**, 248–263 (2012).
 39. K. Choi *et al.*, Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.* **45**, 1327–36 (2013).
 40. S. Shilo, C. Melamed-Bessudo, Y. Dorone, N. Barkai, A. A. Levy, DNA Crossover Motifs Associated with Epigenetic Modifications Delineate Open Chromatin Regions in Arabidopsis. *Plant Cell.* **27**, 2427–2436 (2015).
 41. L. Aliyeva-Schnorr *et al.*, Cytogenetic mapping with centromeric bacterial artificial chromosomes contigs shows that this recombination-poor region comprises more than half of barley chromosome 3H. *Plant J.* **84**, 385–394 (2015).
 42. T. Wu, M. Lichten, Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science (80-.)*. **263**, 515–518 (1994).
 43. E. Segal, J. Widom, From DNA sequence to transcriptional behaviour: a quantitative approach. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 443–456 (2009).
 44. L. E. Berchowitz, S. E. Hanlon, J. D. Lieb, G. P. Copenhaver, A positive but complex association between meiotic double-strand break hotspots and open chromatin in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* **19**, 2245–2257 (2009).
45. J. Pan *et al.*, A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation. *Cell.* **144**, 719–731 (2011).
 46. S. Liu *et al.*, Mu Transposon Insertion Sites and Meiotic Recombination Events Co-Localize with Epigenetic Marks for Open Chromatin across the Maize Genome. *PLoS Genet.* **5**, e1000733 (2009).
 47. T. R. Endo, B. S. Gill, The deletion stocks of common wheat. *J. Hered.* **87**, 295–307 (1996).
 48. J. D. Paris, K. M. Haen, B. S. Gill, Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics.* **154**, 823–835 (2000).
 49. E. Paux *et al.*, A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. *Science (80-.)*. **322**, 101–104 (2008).
 50. C. Saintenac *et al.*, Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics.* **181**, 393–403 (2009).
 51. A. J. Lukaszewski, D. Kopecky, G. Linc, Inversions of chromosome arms 4AL and 2BS in wheat invert the patterns of chiasma distribution. *Chromosoma.* **121**, 201–208 (2012).
 52. C. Saintenac *et al.*, Variation in crossover rates across a 3-Mb contig of bread wheat (*Triticum aestivum*) reveals the presence of a meiotic recombination hotspot. *Chromosoma.* **120**, 185–198 (2011).
 53. F. Choulet *et al.*, Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science.* **345**, 1249721 (2014).
 54. K. F. X. Mayer *et al.*, A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science (80-.)*. **345**, 1251788–1251788 (2014).

55. B. Darrier *et al.*, High-Resolution Mapping of Crossover Events in the Hexaploid Wheat Genome Suggests a Universal Recombination Mechanism. *Genetics*. **206**, 1373–1388 (2017).
56. P. B. Talbert, S. Henikoff, Centromeres Convert but Don't Cross. *PLoS Biol.* **8**, e1000326 (2010).
57. G. H. Jones, S. M. Albin, Recombination nodules, chiasmata and crossing-over in the nucleolus organizing short arm of *Allium fistulosum*. *Heredity (Edinb)*. **61**, 217–224 (1988).
58. A. H. Paterson *et al.*, The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*. **457**, 551–556 (2009).
59. H. Fu *et al.*, The highly recombinogenic bz locus lies in an unusually gene-rich region of the maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8903–8908 (2001).
60. H. Fu, Z. Zheng, H. K. Dooner, Recombination rates between adjacent genic and retrotransposon regions in maize vary by 2 orders of magnitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1082–1087 (2002).
61. H. Yao, P. S. Schnable, Cis-effects on meiotic recombination across distinct a1-sh2 intervals in a common zea genetic background. *Genetics*. **170**, 1929–1944 (2005).
62. J. Drouaud *et al.*, Contrasted Patterns of Crossover and Non-crossover at Arabidopsis thaliana Meiotic Recombination Hotspots. *PLoS Genet.* **9** (2013), doi:10.1371/journal.pgen.1003922.
63. L. Duret, G. Marais, C. Biemont, Transposons but not retrotransposons are located preferentially in regions of high recombination rate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **156**, 1661–1669 (2000).
64. H. L. Levin, J. V. Moran, Dynamic interactions between transposable elements and their

- hosts. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 615–627 (2011).
65. C. Barron, P. Neis, A. Zipf, A Comprehensive Framework for Intrinsic OpenStreetMap Quality Analysis. *Trans. GIS.* **18**, 877–895 (2014).
66. R. K. Slotkin, R. Martienssen, Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 272–285 (2007).
67. C. Rizzon, G. Marais, M. Gouy, C. Biémont, Recombination rate and the distribution of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* **12**, 400–407 (2002).
68. H. Liu, L. K. Frankel, T. M. Bricker, Functional complementation of the *Arabidopsis thaliana* psbO1 mutant phenotype with an N-terminally His6-tagged PsbO-1 protein in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1787**, 1029–1038 (2009).
69. H. K. Dooner, I. M. Martinez-Ferez, Recombination Occurs Uniformly within the bronze Gene, a Meiotic Recombination Hotspot in the Maize Genome. *Plant Cell.* **9**, 1633 (2007).
70. L. He, H. K. Dooner, Haplotype structure strongly affects recombination in a maize genetic interval polymorphic for Helitron and retrotransposon insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8410–8416 (2009).
71. E. Rodgers-Melnick *et al.*, Recombination in diverse maize is stable, predictable, and associated with genetic load. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 201413864 (2015).
72. N. E. Yelina *et al.*, DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **29**, 2183–2202 (2015).
73. N. Zamudio *et al.*, DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination. *Genes Dev.* **29**, 1256–1270 (2015).
74. H. J. Muller, The Mechanism of Crossing-Over. **50**, 193–221 (1916).

75. L. Chelysheva *et al.*, Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **3**, 802–813 (2007).
76. L. Chelysheva *et al.*, The *Arabidopsis* HEI10 is a new ZMM protein related to Zip3. *PLoS Genet.* **8** (2012), doi:10.1371/journal.pgen.1002799.
77. N. Macaisne, J. Vignard, R. Mercier, SHOC1 and PTD form an XPF-ERCC1-like complex that is required for formation of class I crossovers. *J. Cell Sci.* **124**, 2687–2691 (2011).
78. L. E. Berchowitz, K. E. Francis, A. L. Bey, G. P. Copenhaver, The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* **3**, 1355–1364 (2007).
79. S. Basu-Roy *et al.*, Hot Regions of Noninterfering Crossovers Coexist with a Nonuniformly Interfering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **195**, 769–779 (2013).
80. E. Bauer *et al.*, Intraspecific variation of recombination rate in maize. *Genome Biol.* **14**, R103 (2013).
81. M. Falque, L. K. Anderson, S. M. Stack, F. Gauthier, O. C. Martin, Two Types of Meiotic Crossovers Coexist in Maize. *Plant Cell.* **21**, 3915–3925 (2009).
82. S. Y. Lam *et al.*, Crossover Interference on Nucleolus Organizing Region-Bearing Chromosomes in *Arabidopsis*. *Genetics.* **170**, 807–812 (2005).
83. L. K. Anderson *et al.*, Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13415–13420 (2014).
84. J. D. Higgins *et al.*, Spatiotemporal Asymmetry of the Meiotic Program Underlies the Predominantly Distal Distribution of Meiotic Crossovers in Barley. *Plant Cell.* **24**, 4096–4109 (2012).
85. D. Phillips *et al.*, The effect of temperature on the male and female recombination

- landscape of barley. *New Phytol.* **208**, 421–429 (2015).
86. T. Draeger, G. Moore, Short periods of high temperature during meiosis prevent normal meiotic progression and reduce grain number in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **130**, 1785–1800 (2017).
87. J. L. Modliszewski *et al.*, Elevated temperature increases meiotic crossover frequency via the interfering (Type I) pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **14**, 1–15 (2018).
88. N. De Storme, D. Geelen, The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: Biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell Environ.* **37**, 1–18 (2014).
89. M.-D. Rey *et al.*, Magnesium Increases Homoeologous Crossover Frequency During Meiosis in ZIP4 (Ph1 Gene) Mutant Wheat-Wild Relative Hybrids. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–12 (2018).
90. K. J. Hillers, V. Jantsch, E. Martinez-Perez, J. L. Yanowitz, Meiosis. *WormBook.* **241**, 1–43 (2017).
91. F. Hartung *et al.*, An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr. Biol.* **12**, 1787–1791 (2002).
92. K. Sugimoto-Shirasu, N. J. Stacey, J. Corsar, K. Roberts, M. C. McCann, DNA Topoisomerase VI Is Essential for Endoreduplication in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**, 1782–1786 (2002).
93. Y. Yin *et al.*, A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10191–6 (2002).
94. X. J. An, Z. Y. Deng, T. Wang, OsSpo11-4, a Rice Homologue of the Archaeal TopVIA Protein, Mediates Double-Strand DNA Cleavage and Interacts with OsTopVIB. *PLoS One.*

- 6**, e20327 (2011).
95. M. Jain, A. K. Tyagi, J. P. Khurana, Overexpression of putative topoisomerase 6 genes from rice confers stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *FEBS J.* **273**, 5245–5260 (2006).
 96. H. Yu *et al.*, OsSPO11-1 is essential for both homologous chromosome pairing and crossover formation in rice. *Chromosoma.* **119**, 625–636 (2010).
 97. A. De Muyt *et al.*, AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* **26**, 4126–4137 (2007).
 98. A. De Muyt *et al.*, A High Throughput Genetic Screen Identifies New Early Meiotic Recombination Functions in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **5**, e1000654 (2009).
 99. J. Miao *et al.*, Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res.* **23**, 1233–1236 (2013).
 100. K.-I. Nonomura *et al.*, The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell.* **16**, 1008–20 (2004).
 101. C. Zhang *et al.*, The Arabidopsis thaliana DSB formation (AtDFO) gene is required for meiotic double-strand break formation. *Plant J.* **72**, 271–281 (2012).
 102. R. Kumar, H.-M. Bourbon, B. de Massy, Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev.* **24**, 1266–1280 (2010).
 103. A. Ronceret, M.-P. Doutriaux, I. N. Golubovskaya, W. P. Pawlowski, PHS1 regulates meiotic recombination and homologous chromosome pairing by controlling the transport of RAD50 to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20121–20126 (2009).
 104. S. A. Boden, P. Langridge, G. Spangenberg, J. A. Able, TaASY1 promotes homologous

- chromosome interactions and is affected by deletion of Ph1. *Plant J.* **57**, 487–497 (2009).
105. M. J. Neale, J. Pan, S. Keeney, Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature.* **436**, 1053–1057 (2005).
 106. A. Shibata, P. Jeggo, M. Löbrich, The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair (Amst).* **71**, 164–171 (2018).
 107. C. Uanschou *et al.*, A novel plant gene essential for meiosis is related to the human CtIP and the yeast COM1/SAE2 gene. *EMBO J.* **26**, 5061–5070 (2007).
 108. J. Puizina, J. Siroky, P. Mokros, D. Schweizer, K. Riha, Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell.* **16**, 1968–78 (2004).
 109. S. K. Binz, M. S. Wold, Regulatory Functions of the N-terminal Domain of the 70-kDa Subunit of Replication Protein A (RPA). *J. Biol. Chem.* **283**, 21559–21570 (2008).
 110. M. T. Limborg, G. J. McKinney, L. W. Seeb, J. E. Seeb, Recombination patterns reveal information about centromere location on linkage maps. *Mol. Ecol. Resour.* **16**, 655–661 (2016).
 111. B. B. Aklilu, R. S. Soderquist, K. M. Culligan, Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in Arabidopsis reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3104–3118 (2014).
 112. V. Eschbach, D. Kobbe, Different replication protein a complexes of Arabidopsis thaliana have different DNA-binding properties as a function of heterotrimer composition. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1460–1472 (2014).
 113. R. Ishibashi, A. Komaru, Abortive second meiosis detected in cytochalasin-treated eggs in androgenetic diploid *Corbicula fluminea*. *Dev. Growth Differ.* **48**, 277–282 (2006).
 114. K. Sakaguchi, T. Ishibashi, Y. Uchiyama, K. Iwabata, The multi-replication protein A

- (RPA) system - A new perspective. *FEBS J.* **276**, 943–963 (2009).
115. M.-T. Kurzbauer, C. Uanschou, D. Chen, P. Schlogelhofer, The Recombinases DMC1 and RAD51 Are Functionally and Spatially Separated during Meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell.* **24**, 2058–2070 (2012).
 116. V. Cloud, Y. Chan, J. Grubb, B. Budke, K. Douglas, NIH Public Access. **337**, 1222–1225 (2014).
 117. O. Da Ines *et al.*, Meiotic Recombination in Arabidopsis Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLoS Genet.* **9** (2013), doi:10.1371/journal.pgen.1003787.
 118. J. Vignard *et al.*, The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **3**, 1894–1906 (2007).
 119. F. Couteau, M. Zetka, HTP-1 coordinates synaptonemal complex assembly with homolog alignment during meiosis in *C. elegans*. *Genes Dev.* **19**, 2744–56 (2005).
 120. Z.-Y. Deng, T. Wang, OsDMC1 is required for homologous pairing in *Oryza sativa*. *Plant Mol. Biol.* **65**, 31–42 (2007).
 121. J. P. Lao *et al.*, Meiotic Crossover Control by Concerted Action of Rad51-Dmc1 in Homolog Template Bias and Robust Homeostatic Regulation. *PLoS Genet.* **9**, e1003978 (2013).
 122. H. Tsubouchi, G. S. Roeder, Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. *Genes Dev.* **20**, 1766–75 (2006).
 123. S. D. Sheridan *et al.*, A comparative analysis of Dmc1 and Rad51 nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4057–4066 (2008).
 124. E. Sanchez-Moran, J. L. Santos, G. H. Jones, F. C. H. Franklin, ASY1 mediates AtDMC1-

- dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev.* **21**, 2220–2233 (2007).
125. W. Crismani *et al.*, MCM8 Is Required for a Pathway of Meiotic Double-Strand Break Repair Independent of DMC1 in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **9**, e1003165 (2013).
 126. E. Dray, N. Siaud, E. Dubois, M.-P. Doutriaux, Interaction between Arabidopsis Brca2 and Its Partners Rad51, Dmc1, and Dss1. *PLANT Physiol.* **140**, 1059–1069 (2006).
 127. N. Siaud *et al.*, Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis thaliana as suggested by its interaction with Dmc1. *EMBO J.* **23**, 1392–1401 (2004).
 128. J. D. Higgins, S. J. Armstrong, F. C. H. Franklin, G. H. Jones, The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: Evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. *Genes Dev.* **18**, 2557–2570 (2004).
 129. J. D. Higgins *et al.*, AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in Arabidopsis thaliana, but is not required for synapsis. *Plant J.* **55**, 28–39 (2008).
 130. N. Macaisne *et al.*, SHOC1, an XPF Endonuclease-Related Protein, Is Essential for the Formation of Class I Meiotic Crossovers. *Curr. Biol.* **18**, 1432–1437 (2008).
 131. A. J. Wijeratne, C. Chen, W. Zhang, L. Timofejeva, H. Ma, The Arabidopsis thaliana PARTING DANCERS Gene Encoding a Novel Protein Is Required for Normal Meiotic Homologous Recombination. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 1331–1343 (2006).
 132. C. Chen, W. Zhang, L. Timofejeva, Y. Gerardin, H. Ma, The Arabidopsis ROCK-N-ROLLERS gene encodes a homolog of the yeast ATP-dependent DNA helicase MER3 and is required for normal meiotic crossover formation. *Plant J.* **43**, 321–334 (2005).
 133. Q. Luo *et al.*, The Role of OsMSH5 in Crossover Formation during Rice Meiosis. *Mol. Plant.* **6**, 729–742 (2013).
 134. Y. Chang *et al.*, Replication Protein A (RPA1a) Is Required for Meiotic and Somatic DNA

- Repair But Is Dispensable for DNA Replication and Homologous Recombination in Rice. *PLANT Physiol.* **151**, 2162–2173 (2009).
135. Y. Shen *et al.*, ZIP4 in homologous chromosome synapsis and crossover formation in rice meiosis. *J. Cell Sci.* **125**, 2581–2591 (2012).
136. K. Wang *et al.*, MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice. *J. Cell Sci.* **122**, 2055–2063 (2009).
137. K. Wang *et al.*, The Role of Rice HEI10 in the Formation of Meiotic Crossovers. *PLoS Genet.* **8**, e1002809 (2012).
138. N. Jackson *et al.*, Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in AtMLH3-deficient Arabidopsis. *EMBO J.* **25**, 1315–1323 (2006).
139. M. Wang *et al.*, The Central Element Protein ZEP1 of the Synaptonemal Complex Regulates the Number of Crossovers during Meiosis in Rice. *Plant Cell.* **22**, 417–430 (2010).
140. I. Colas *et al.*, A spontaneous mutation in MutL-Homolog 3 (HvMLH3) affects synapsis and crossover resolution in the barley desynaptic mutant des10. *New Phytol.* **212**, 693–707 (2016).
141. L. Chelysheva *et al.*, An Easy Protocol for Studying Chromatin and Recombination Protein Dynamics during Arabidopsisthaliana Meiosis: Immunodetection of Cohesins, Histones and MLH1. *Cytogenet. Genome Res.* **129**, 143–153 (2010).
142. A. Ciccia, N. McDonald, S. C. West, Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 259–287 (2008).
143. A. Agostinho *et al.*, Combinatorial Regulation of Meiotic Holliday Junction Resolution in *C. elegans* by HIM-6 (BLM) Helicase, SLX-4, and the SLX-1, MUS-81 and XPF-1 Nucleases. *PLoS Genet.* **9**, e1003591 (2013).

144. J. J. Sekelsky, K. S. McKim, G. M. Chin, R. S. Hawley, The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1. *Genetics*. **141**, 619–27 (1995).
145. K. Zakharyevich, S. Tang, Y. Ma, N. Hunter, Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase. *Cell*. **149**, 334–347 (2012).
146. M. Bauknecht, D. Kobbe, AtGEN1 and AtSEND1, Two Paralogs in Arabidopsis, Possess Holliday Junction Resolvase Activity. *Plant Physiol*. **166**, 202–216 (2014).
147. K. Yano *et al.*, Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep*. **9**, 91–96 (2008).
148. L. Chelysheva, D. Vezon, K. Belcram, G. Gendrot, M. Grelon, The Arabidopsis BLAP75/Rmi1 homologue plays crucial roles in meiotic double-strand break repair. *PLoS Genet*. **4** (2008), doi:10.1371/journal.pgen.1000309.
149. F. Hartung, S. Suer, A. Knoll, R. Wurz-Wildersinn, H. Puchta, Topoisomerase 3 α and RMI1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet*. **4** (2008), doi:10.1371/journal.pgen.1000285.
150. L. Wu, I. D. Hickson, The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. **426**, 870–874 (2003).
151. H. Serra *et al.*, Massive crossover elevation via combination of HEI10 and *recq4a recq4b* during Arabidopsis meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **115**, 2437–2442 (2018).
152. T. De los Santos *et al.*, The MUS81/MMS4 endonuclease acts independently of double-holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics*. **164**, 81–94 (2003).

153. S. Sarbajna, D. Davies, S. C. West, Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes Dev.* **28**, 1124–1136 (2014).
154. C. Girard *et al.*, AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLOS Genet.* **11**, e1005369 (2015).
155. A. Knoll *et al.*, The Fanconi Anemia Ortholog FANCM Ensures Ordered Homologous Recombination in Both Somatic and Meiotic Cells in Arabidopsis. *Plant Cell.* **24**, 1448–1464 (2012).
156. C. Melamed-Bessudo, A. A. Levy, Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E981–E988 (2012).
157. M. Mirouze *et al.*, Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5880–5885 (2012).
158. N. E. Yelina *et al.*, Epigenetic Remodeling of Meiotic Crossover Frequency in Arabidopsis thaliana DNA Methyltransferase Mutants. *PLoS Genet.* **8**, e1002844 (2012).
159. M. Séguéla-Arnaud *et al.*, Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 α and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 4713–4718 (2015).
160. C. Lambing *et al.*, Arabidopsis PCH2 Mediates Meiotic Chromosome Remodeling and Maturation of Crossovers. *PLOS Genet.* **11**, e1005372 (2015).
161. M. T. Jahns *et al.*, Crossover Localisation Is Regulated by the Neddylation Posttranslational Regulatory Pathway. *PLoS Biol.* **12**, e1001930 (2014).
162. Y. Duroc *et al.*, The Kinesin AtPSS1 Promotes Synapsis and is Required for Proper Crossover Distribution in Meiosis. *PLoS Genet.* **10**, e1004674 (2014).
163. A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting.

- Science* (80-.). **333**, 1843–1846 (2011).
164. D. F. Voytas, C. Gao, Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges. *PLoS Biol.* **12**, e1001877 (2014).
 165. F. Paques, P. Duchateau, Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* **7**, 49–66 (2007).
 166. J. Smith *et al.*, A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, e149–e149 (2006).
 167. F. Delacôte *et al.*, High Frequency Targeted Mutagenesis Using Engineered Endonucleases and DNA-End Processing Enzymes. *PLoS One.* **8**, e53217 (2013).
 168. K. D’Halluin *et al.*, Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 933–941 (2013).
 169. A. Honig *et al.*, Transient Expression of Virally Delivered Meganuclease In Planta Generates Inherited Genomic Deletions. *Mol. Plant.* **8**, 1292–1294 (2015).
 170. D. Youssef *et al.*, Induction of Targeted Deletions in Transgenic Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Using Customized Meganuclease. *Plant Mol. Biol. Report.* **36**, 71–81 (2018).
 171. S. Kim, J.-S. Kim, Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnol. Rep.* **5**, 9–17 (2011).
 172. F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, P. D. Gregory, Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 636–646 (2010).
 173. H. J. Lee, E. Kim, J.-S. Kim, Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res.* **20**, 81–89 (2010).
 174. C. Şöllü *et al.*, Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8269–8276 (2010).
 175. J. F. Petolino *et al.*, Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. *Plant Mol. Biol.* **73**,

- 617–628 (2010).
176. D. M. Weinthal, R. A. Taylor, T. Tzfira, Nonhomologous End Joining-Mediated Gene Replacement in Plant Cells. *PLANT Physiol.* **162**, 390–400 (2013).
 177. W. M. Ainley *et al.*, Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 1126–1134 (2013).
 178. V. K. Shukla *et al.*, Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* **459**, 437–441 (2009).
 179. Y. Ran *et al.*, Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 2088–2101 (2018).
 180. C. L. Ramirez *et al.*, Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods.* **5**, 374–5 (2008).
 181. C. Mussolino *et al.*, A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9283–9293 (2011).
 182. S. Kay, S. Hahn, E. Marois, G. Hause, U. Bonas, A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science (80-.).* **318**, 648–651 (2007).
 183. P. Römer *et al.*, Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science (80-.).* **318**, 645–648 (2007).
 184. J. Boch, U. Bonas, Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 419–436 (2010).
 185. J. Boch *et al.*, Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* **326**, 1509–12 (2009).
 186. M. J. Moscou, A. J. Bogdanove, A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL

- Effectors. *Science* (80-.). **326**, 1501–1501 (2009).
187. D. Deng *et al.*, Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* (80-.). **335**, 720–723 (2012).
188. W. Liu *et al.*, Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. *Plant Biotechnol. J.* **12**, 436–446 (2014).
189. Y. Wang *et al.*, Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* **32**, 947–51 (2014).
190. J. Valton *et al.*, Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 38427–38432 (2012).
191. D. Reyon *et al.*, FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* **30**, 460–465 (2012).
192. M. Jinek *et al.*, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816–21 (2012).
193. Q. Shan *et al.*, Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* **31**, 686–688 (2013).
194. K. Belhaj, A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, V. Nekrasov, Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods.* **9**, 39 (2013).
195. V. Nekrasov, B. Staskawicz, D. Weigel, J. D. G. Jones, S. Kamoun, Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 691–693 (2013).
196. Q. Shan, Y. Wang, J. Li, C. Gao, Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.* **9**, 2395–2410 (2014).
197. D. Jaganathan, K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, G. Venkataraman, CRISPR for

- Crop Improvement: An Update Review. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–17 (2018).
198. Y. Zhang *et al.*, Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* **7**, 1–8 (2016).
199. W. Wang *et al.*, Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of TaGW2 homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **131**, 2463–2475 (2018).
200. A. Peciña *et al.*, Targeted Stimulation of Meiotic Recombination. *Cell.* **111**, 173–184 (2002).
201. M. Johnston, A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**, 458–76 (1987).
202. S. Klapholz, C. S. Waddell, R. E. Esposito, The role of the SPO11 gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics.* **110**, 187–216 (1985).
203. L. Cao, E. Alani, N. Kleckner, A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell.* **61**, 1089–1101 (1990).
204. M. Grelon, D. Vezon, G. Gendrot, G. Pelletier, AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**, 589–600 (2001).
205. N. J. Stacey *et al.*, Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**, 206–216 (2006).
206. T. Sprink, F. Hartung, The splicing fate of plant SPO11 genes. *Front. Plant Sci.* **5**, 214 (2014).
207. S. B. Malik, M. A. Ramesh, A. M. Hulstrand, J. M. Logsdon, Protist homologs of the meiotic Spo11 gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineage-specific loss. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 2827–2841 (2007).
208. F. Hartung *et al.*, The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2

- are required for meiotic double-strand break induction in Arabidopsis. *Plant Cell*. **19**, 3090–9 (2007).
209. T. Robert, N. Vrielynck, C. Mézard, B. de Massy, M. Grelon, A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* **54**, 165–176 (2016).
210. Z. Xue *et al.*, OsMTOPIVIB Promotes Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in Rice. *Mol. Plant*. **9**, 1535–1538 (2016).
211. C. C. Bouuaert, S. Keeney, Breaking DNA. *Science (80-.)*. **351**, 916–917 (2016).
212. G. Stebbins, E. Arnold, Ed. (London, 1971), p. 216.
213. J. Masterson, Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science (80-.)*. **264**, 421–424 (1994).
214. M. C. Sattler, C. R. Carvalho, W. R. Clarindo, The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. **243**, 281–296 (2016).
215. Y. Jiao *et al.*, Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*. **473**, 97–100 (2011).
216. J. Ramsey, D. W. Schemske, PATHWAYS, MECHANISMS, AND RATES OF POLYPLOID FORMATION IN FLOWERING PLANTS. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 467–501 (1998).
217. F. BRETAGNOLLE, J. D. THOMPSON, Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* **129**, 1–22 (1995).
218. S. Pietro Ferrante *et al.*, Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n = 4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica*. **173**, 223–233 (2010).
219. Y. Van De Peer, S. Maere, A. Meyer, The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 725–732 (2009).

220. J. A. Fawcett, S. Maere, Y. Van de Peer, Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5737–5742 (2009).
221. G. Stebbins, *Variation and Evolution in Plants* (New York, NY, 1950).
222. J. D. Hollister *et al.*, Genetic Adaptation Associated with Genome-Doubling in Autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genet.* **8**, e1003093 (2012).
223. J. Sybenga, *Cytogenetics in Plant Breeding* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1992; <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-84083-8>), vol. 17 of *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*.
224. J. Ramsey, D. W. Schemske, Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**, 589–639 (2002).
225. L. Grandont, E. Jenczewski, A. Lloyd, Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants. *Cytogenet. Genome Res.* **140**, 171–184 (2013).
226. L. Yant *et al.*, Meiotic Adaptation to Genome Duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Curr. Biol.* **23**, 2151–2156 (2013).
227. E. Jenczewski, K. Alix, From Diploids to Allopolyploids: The Emergence of Efficient Pairing Control Genes in Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 21–45 (2004).
228. T. Sutton *et al.*, The Ph2 pairing homoeologous locus of wheat (*Triticum aestivum*): identification of candidate meiotic genes using a comparative genetics approach. *Plant J.* **36**, 443–456 (2003).
229. A. H. Lloyd, A. S. Milligan, P. Langridge, J. A. Able, TaMSH7: A cereal mismatch repair gene that affects fertility in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol.* **7**, 67 (2007).
230. R. RILEY, V. CHAPMAN, Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of

Hexaploid Wheat. *Nature* (1958).

231. R. RILEY, V. CHAPMAN, G. KIMBER, Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature*. **183**, 1244–6 (1959).
232. S. Griffiths *et al.*, Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*. **439**, 749–752 (2006).
233. N. Al-Kaff *et al.*, Detailed dissection of the chromosomal region containing the Ph1 locus in wheat *Triticum aestivum*: With deletion mutants and expression profiling. *Ann. Bot.* **101**, 863–872 (2008).
234. E. Greer *et al.*, The Ph1 Locus Suppresses Cdk2-Type Activity during Premeiosis and Meiosis in Wheat. *Plant Cell*. **24**, 152–162 (2012).
235. M. D. Rey *et al.*, Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol. Breed.* **37** (2017), doi:10.1007/s11032-017-0700-2.
236. V. CHAPMAN, R. RILEY, Homoeologous Meiotic Chromosome Pairing in *Triticum aestivum* in which Chromosome 5B is replaced by an Alien Homoeologue. *Nature*. **226**, 376–377 (1970).
237. A. C. Martín, M. D. Rey, P. Shaw, G. Moore, Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma*. **126**, 669–680 (2017).
238. T. Mello-Sampayo, Genetic Regulation of Meiotic Chromosome Pairing by Chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nat. New Biol.* **230**, 22–23 (1971).
239. T. Mello-Sampayo, R. Lorente, (EWAC Newsl, 1968), pp. 16–24.
240. T. Mello-Sampayo, P. Canas, in *Fourth Int Wheat Genet Symp* (Columbia, Missouri, 1973), pp. 709–713.
241. C. J. Driscoll, GENETIC SUPPRESSION OF HOMOEOLOGOUS CHROMOSOME

- PAIRING IN HEXAPLOID WHEAT. *Can. J. Genet. Cytol.* **14**, 39–42 (1972).
242. A. J. Lukaszewski, C. A. Curtis, Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 121–127 (1993).
243. K. S. Gill, B. S. Gill, T. R. Endo, E. V Boyko, Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics.* **143**, 1001–12 (1996).
244. K. S. Gill, B. S. Gill, T. R. Endo, T. Taylor, Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics.* **144**, 1883–91 (1996).
245. T. Naranjo, Forcing the shift of the crossover site to proximal regions in wheat chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **128**, 1855–1863 (2015).
246. I. Colas *et al.*, Observation of Extensive Chromosome Axis Remodeling during the “Diffuse-Phase” of Meiosis in Large Genome Cereals. *Front. Plant Sci.* **8**, 1–9 (2017).
247. U. K. Devisetty, K. Mayes, S. Mayes, The RAD51 and DMC1 homoeologous genes of bread wheat: cloning, molecular characterization and expression analysis. *BMC Res. Notes.* **3**, 245 (2010).
248. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
249. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science.* **345**, 1251788 (2014).
250. M. D. Curtis, U. Grossniklaus, A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Breakthr. Technol.* **133**, 462–469 (2003).
251. O. da Ines, K. Abe, C. Goubely, M. E. Gallego, C. I. White, Differing requirements for RAD51 and DMC1 in meiotic pairing of centromeres and chromosome arms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **8** (2012), doi:10.1371/journal.pgen.1002636.

252. S. J. Clough, A. F. Bent, Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
253. P. J. Kersey *et al.*, Ensembl Genomes 2018: An integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res.* **46**, D802–D808 (2018).
254. D. R. Zerbino *et al.*, Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
255. M. Van Bel *et al.*, Dissecting Plant Genomes with the PLAZA Comparative Genomics Platform. *Plant Physiol.* **158**, 590–600 (2012).
256. A. Dereeper *et al.*, Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, 465–469 (2008).
257. A. Dereeper, S. Audic, J. M. Claverie, G. Blanc, BLAST-EXPLORER helps you build datasets for phylogenetic analysis. *Evol. Biol.* **10**, 8–13 (2010).
258. K. J. Ross, P. Fransz, G. H. Jones, A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosom. Res.* **4**, 507–516 (1996).
259. S. Kurtz, A. Narechania, J. C. Stein, D. Ware, A new method to compute K-mer frequencies and its application to annotate large repetitive plant genomes. *BMC Genomics.* **9**, 517 (2008).
260. a H. Christensen, P. H. Quail, Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* **5**, 213–218 (1996).
261. C. Tassy, A. Partier, M. Beckert, C. Feuillet, P. Barret, Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **119**, 171–181 (2014).
262. M. Wright *et al.*, Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable

- marker. *Plant Cell Rep.* **20**, 429–436 (2001).
263. P. Stoykova, P. Stoeva-Popova, PMI (manA) as a nonantibiotic selectable marker gene in plant biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **105**, 141–148 (2011).
264. S. M. Smith, P. J. Maughan, (2015; http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1966-6_18), pp. 243–256.
265. E. Paux *et al.*, Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 196–210 (2010).
266. International Wheat Genome Sequencing Consortium *et al.*, Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* (80-.). **To be publ**, eaar7191 (2018).
267. J. G. Burleigh *et al.*, Genome-Scale Phylogenetics: Inferring the Plant Tree of Life from 18,896 Gene Trees. *Syst. Biol.* **60**, 117–125 (2011).
268. A. S. Chanderbali, B. A. Berger, D. G. Howarth, P. S. Soltis, D. E. Soltis, Evolving Ideas on the Origin and Evolution of Flowers: New Perspectives in the Genomic Era. *Genetics.* **202**, 1255–1265 (2016).
269. G. Petersen, O. Seberg, M. Yde, K. Berthelsen, Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **39**, 70–82 (2006).
270. J. Dvořák, P. di Terlizzi, H.-B. Zhang, P. Resta, The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome.* **36**, 21–31 (1993).
271. Y. Shingu, T. Mikawa, M. Onuma, T. Hirayama, T. Shibata, A DNA-binding surface of SPO11-1, an Arabidopsis SPO11 orthologue required for normal meiosis. *FEBS J.* **277**, 2360–2374 (2010).

272. F. Hartung, H. Puchta, Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1548–1554 (2000).
273. C. Chen *et al.*, Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-Seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes. *BMC Plant Biol.* **10** (2010), doi:10.1186/1471-2229-10-280.
274. H. Yang, P. Lu, Y. Wang, H. Ma, The transcriptome landscape of *Arabidopsis* male meiocytes from high-throughput sequencing: the complexity and evolution of the meiotic process. *Plant J.* **65**, 503–516 (2011).
275. J. Walker *et al.*, Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* **50**, 130–137 (2018).
276. N. Vrielynck *et al.*, A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science (80-.)*. **351**, 939–943 (2016).
277. T. L. Bailey *et al.*, MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, 202–208 (2009).
278. W. Zhu *et al.*, Altered chromatin compaction and histone methylation drive non-additive gene expression in an interspecific *Arabidopsis* hybrid. *Genome Biol.* **18**, 157 (2017).
279. H. Hamada *et al.*, An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* **7**, 2–9 (2017).
280. L. Rooke, D. Byrne, S. Salgueiro, Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Ann. Appl. Biol.* **136**, 167–172 (2000).
281. R. Michard *et al.*, Cold-conserved hybrid immature embryos for efficient wheat transformation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* (2018), doi:10.1007/s11240-018-1521-7.
282. A. Geard, C. J. Spurr, P. H. Brown, in *Seeds: biology, development and ecology. Proceedings of the Eighth International Workshop on Seeds, Brisbane, Australia, May 2005*, S. W. Adkins, S. Ashmore, S. C. Navie, Eds. (CABI, Wallingford, 2007;

<http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20073071796>), pp. 120–129.

283. E. A. Golovina, F. A. Hoekstra, A. C. Van Aelst, The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. *J. Exp. Bot.* **52**, 1015–27 (2001).
284. A. Fábrián, K. Jäger, M. Rakszegi, B. Barnabás, Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Rep.* **30**, 551–63 (2011).
285. S. M. Pescitelli, C. D. Johnson, J. F. Petolino, Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Rep.* **8**, 628–31 (1990).
286. E. Kiviharju, E. Pehu, The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **54**., 97–104 (1998).
287. J. Luo, S. Jiang, L. Pan, Cold-enhanced somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with exogenous calcium during cold pretreatment. *Plant Growth Regul.* **40**, 171–177 (2003).
288. R. B. Malabadi, J. van Staden, Cold-enhanced somatic embryogenesis in *Pinus patula* is mediated by calcium. *South African J. Bot.* **72**, 613–618 (2006).
289. H. H. Gu, P. Hagberg, W. J. Zhou, Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regul.* **42**, 137–143 (2004).
290. I. A. Montalbán, O. García-Mendiguren, T. Goicoa, M. D. Ugarte, P. Moncaleán, Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New For.* **46**, 309–317 (2015).
291. B. Li, K. Caswell, N. Leung, R. N. Chibbar, Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: Days post anthesis, days of spike storage, and

- sucrose concentration affect efficiency. *Vitr. Cell. Dev. Biol. -Plant.* **39**, 20–23 (2003).
292. A. Lublin, S. Sela, The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the Eggs. *Poult. Sci.* **87**, 2208–14 (2008).
293. S. F. Bailey, Thrips as Vectors of Plant Disease. *J. Econ. Entomol.* **28**, 856–863 (1935).
294. T. K. Hodges, K. K. Kamo, C. W. Imbrie, M. R. Becwar, Genotype Specificity of Somatic Embryogenesis and Regeneration in Maize. *Nat. Biotechnol.* **4**, 219–223 (1986).
295. J. A. Birchler, H. Yao, S. Chudalayandi, D. Vaiman, R. A. Veitia, Heterosis. *Plant Cell.* **22**, 2105–12 (2010).
296. I. M. Ben Amer, A. J. Worland, V. Korzun, A. Börner, Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. *TAG Theor. Appl. Genet.* **94**, 1047–1052 (1997).
297. H. Bolibok, M. Rakoczy-Trojanowska, Genetic Mapping of QTLs for Tissue-Culture Response in Plants. *Euphytica.* **149**, 73–83 (2006).
298. H. Jia *et al.*, Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol. Cells.* **23**, 323–30 (2007).
299. S. Rasco-Gaunt, A. Riley, M. Cannell, P. Barcelo, P. a Lazzeri, Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* **52**, 865–74 (2001).
300. L. S. Kulnane, E. J. H. Lehman, B. J. Hock, K. D. Tsuchiya, B. T. Lamb, Rapid and efficient detection of transgene homozygosity by FISH of mouse fibroblasts. *Mamm. Genome.* **13**, 223–226 (2002).
301. Z. Liang, A. M. Breman, B. R. Grimes, E. D. Rosen, Identifying and genotyping transgene

- integration loci. *Transgenic Res.* **17**, 979–983 (2008).
302. A. J. Dubose *et al.*, Use of microarray hybrid capture and next-generation sequencing to identify the anatomy of a transgene. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10–14 (2013).
303. Y. Ji *et al.*, Identification of the genomic insertion site of Pmel-1 TCR α and β Transgenes by next-generation sequencing. *PLoS One.* **9** (2014), doi:10.1371/journal.pone.0096650.
304. R. P. Singh *et al.*, Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* **54**, 303–322 (2016).
305. M. Fossi, K. R. Amundson, S. Kuppu, A. B. Britt, L. Comai, *Plant Physiol.*, in press, doi:10.1104/pp.18.00906.
306. A. H. Lloyd *et al.*, Meiotic Gene Evolution: Can You Teach a New Dog New Tricks? *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1724–1727 (2014).
307. J. B. Frenette Charron, G. Breton, M. Badawi, F. Sarhan, Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. *FEBS Lett.* **517**, 129–132 (2002).
308. X. Y. Zhao, M. Sen Liu, J. R. Li, C. M. Guan, X. S. Zhang, The wheat TaGI1, involved in photoperiodic flowering, encodes an Arabidopsis GI ortholog. *Plant Mol. Biol.* **58**, 53–64 (2005).
309. S. Proietti *et al.*, Cross activity of orthologous WRKY transcription factors in wheat and Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **62**, 1975–1990 (2011).
310. C. Somerville, S. Somerville, Plant functional genomics. *Science.* **285**, 380–3 (1999).
311. B. Clarke, M. Lambrecht, S. Y. Rhee, Arabidopsis genomic information for interpreting wheat EST sequences. *Funct. Integr. Genomics.* **3**, 33–38 (2003).
312. R. J. Konopka, S. Benzer, 1971 Konopka & Benzer PNAS.pdf. **68**, 2112–2116 (1971).
313. A. Shearn, Complementation analysis of late lethal mutants of *Drosophila melanogaster*.

- Genetics*. **77**, 115–125 (1974).
314. M. E. Dorf, B. Benacerraf, Complementation of H-2-linked Ir genes in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 3671–3675 (2006).
315. H.-C. Chiang *et al.*, Gene-Specific Genetic Complementation between Brca1 and Cobral During Mouse Mammary Gland Development. *Sci. Rep.* **8**, 2731 (2018).
316. J. M. Gurung *et al.*, Heterologous Complementation Studies With the YscX and YscY Protein Families Reveals a Specificity for Yersinia pseudotuberculosis Type III Secretion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–16 (2018).
317. M. Doumith, R. Legrand, C. Lang, J. A. Salas, M.-C. Raynal, Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea* : elucidation of the function of oleP1, oleG1 and oleG2 from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* and generation of new erythromycin derivatives. *Mol. Microbiol.* **34**, 1039–1048 (1999).
318. L. Monferrer, R. Artero, An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses. *J. Hered.* **97**, 67–73 (2006).
319. J. M. Lohmar, O. Puel, J. W. Cary, A. M. Calvo, The rtfA gene regulates plant and animal pathogenesis and secondary metabolism in *Aspergillus flavus* . *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–19 (2019).
320. S. R. Norris, X. Shen, D. DellaPenna, Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* **117**, 1317–23 (1998).
321. R. Zhang, X. Xia, K. Lindsey, P. S. C. F. Da Rocha, Functional complementation of dwf4 mutants of *Arabidopsis* by overexpression of CYP724A1. *J. Plant Physiol.* **169**, 421–428 (2012).

322. G. H. Lilay, P. H. Castro, A. Campilho, A. G. L. Assunção, The Arabidopsis bZIP19 and bZIP23 Activity Requires Zinc Deficiency – Insight on Regulation From Complementation Lines. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–13 (2019).
323. T. Fan *et al.*, Complementation studies of the Arabidopsis *fc1* mutant substantiate essential functions of ferrochelatase 1 during embryogenesis and salt stress. *Plant Cell Environ.* **42**, 618–632 (2019).
324. L. Gomez, M. J. Chrispeels, Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 1829–1833 (1994).
325. X. Dong, Functional Conservation of Plant Secondary Metabolic Enzymes Revealed by Complementation of Arabidopsis Flavonoid Mutants with Maize Genes. *PLANT Physiol.* **127**, 46–57 (2001).
326. M. Fu *et al.*, The DNA Topoisomerase VI-B Subunit OsMTOPIVIB Is Essential for Meiotic Recombination Initiation in Rice. *Mol. Plant.* **9**, 1539–1541 (2016).
327. Y. Shingu *et al.*, The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a Drosophila bioassay. *BMC Mol. Biol.* **13**, 1 (2012).
328. R. L. Brinster, J. M. Allen, R. R. Behringer, R. E. Gelinas, R. D. Palmiter, Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 836–40 (1988).
329. M. Laxa, Intron-Mediated Enhancement: A Tool for Heterologous Gene Expression in Plants? *Front. Plant Sci.* **7**, 1–13 (2017).
330. K. Schreiber, G. Csaba, M. Haslbeck, R. Zimmer, Alternative splicing in next generation sequencing data of *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* **10**, 1–18 (2015).
331. Y. Wang *et al.*, Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review). *Biomed.*

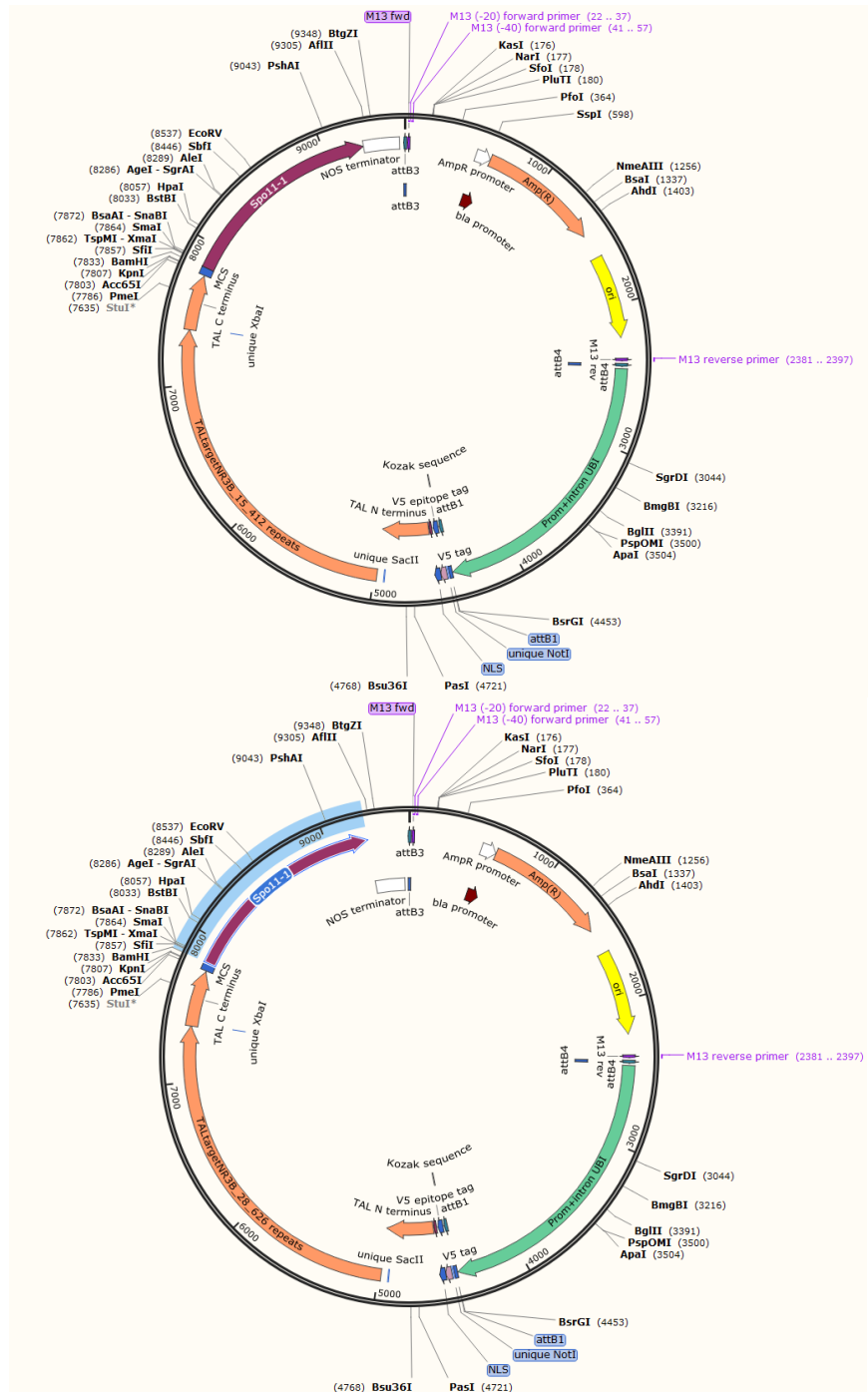
- Reports*. **3**, 152–158 (2015).
332. F. S. Collins, E. S. Lander, J. Rogers, R. H. Waterson, Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. **431**, 931–945 (2004).
333. H. Sierra, M. Cordova, C.-S. J. Chen, M. Rajadhyaksha, Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 612–615 (2015).
334. G. Ast, How did alternative splicing evolve? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 773–782 (2004).
335. N. H. Syed, M. Kalyna, Y. Marquez, A. Barta, J. W. S. Brown, Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends Plant Sci.* **17**, 616–623 (2012).
336. X. Shang, Y. Cao, L. Ma, Alternative Splicing in Plant Genes: A Means of Regulating the Environmental Fitness of Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 432 (2017).
337. J. E. Gallegos, *Plant Cell*, in press, doi:10.1105/tpc.18.00430.
338. C. P. G. Calixto, W. Guo, A. B. James, N. A. Tzioutziou, J. W. S. Brown, Rapid and Dynamic Alternative Splicing Impacts the Arabidopsis. *Plant Cell Adv. Publ. Publ.* **30**, 1424–1444 (2018).
339. A. Miya *et al.*, PNAS-2007-Miya-19613-8.pdf. **104**, 1–6 (2007).
340. D. Kroll *et al.*, VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4238–4242 (2001).
341. T. Cermak *et al.*, Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**, e82–e82 (2011).
342. S. Bultmann, Targeted transcriptional activation of silent. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5368–5377 (2012).
343. A. K. Maunakea *et al.*, Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. **466**, 253–257 (2010).

344. Y. Wang, Y. Zong, C. Gao, (2017; http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7337-8_11), pp. 169–185.
345. S. Toki *et al.*, Expression of a Maize Ubiquitin Gene Promoter-bar Chimeric Gene in Transgenic Rice Plants. *PLANT Physiol.* **100**, 1503–1507 (1992).
346. M.-J. Cornejo, D. Luth, K. M. Blankenship, O. D. Anderson, A. E. Blechl, Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.* **23**, 567–581 (1993).
347. S. Dreissig *et al.*, Measuring Meiotic Crossovers via Multi-Locus Genotyping of Single Pollen Grains in Barley. *PLoS One.* **10**, 1–10 (2015).
348. R. W. Summers, J. K. M. Brown, Constraints on breeding for disease resistance in commercially competitive wheat cultivars. *Plant Pathol.* **62**, 115–121 (2013).
349. J. K. M. Brown, J. C. Rant, Fitness costs and trade-offs of disease resistance and their consequences for breeding arable crops. *Plant Pathol.* **62**, 83–95 (2013).
350. P. R. Shewry, N. G. Halford, Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* **53**, 947–958 (2002).
351. R. G. Allaby, M. Banerjee, T. A. Brown, Evolution of the high molecular weight glutenin loci of the A, B, D, and G genomes of wheat. *Genome.* **42**, 296–307 (1999).
352. P. R. Shewry, A. S. Tatham, The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* **267**, 1–12 (1990).
353. Q. G. Yong *et al.*, Types and rates of sequence evolution at the high-molecular-weight glutenin locus in hexaploid wheat and its ancestral genomes. *Genetics.* **174**, 1493–1504 (2006).

8 ANNEXES

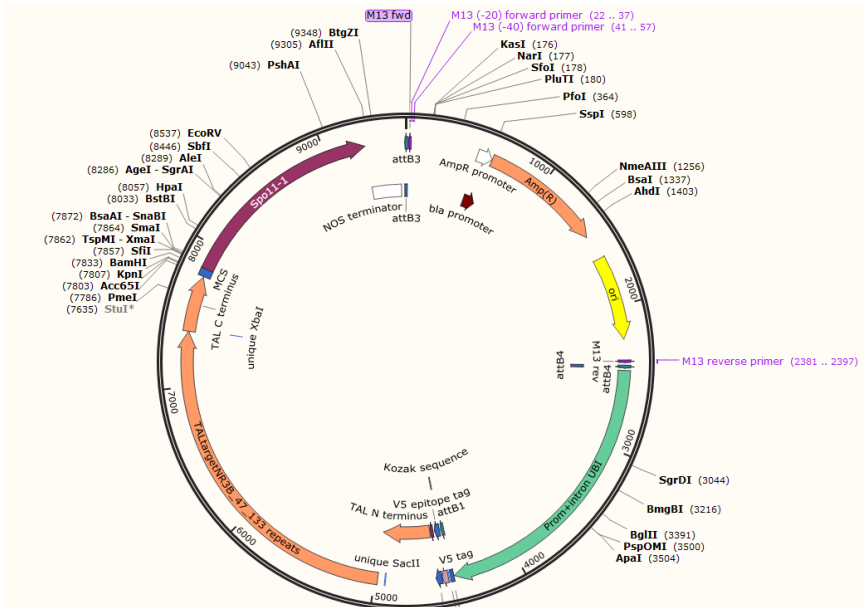
Annexe 1 : Cartes des vecteurs plasmidiques

TAL15-SPO11-1

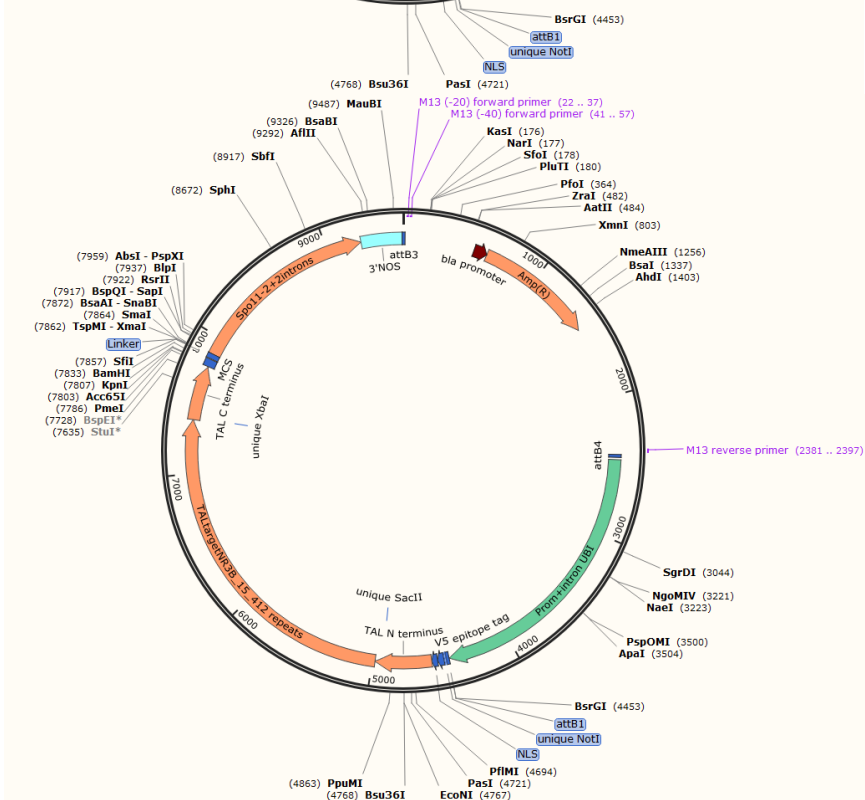


TAL28-SPO11-1

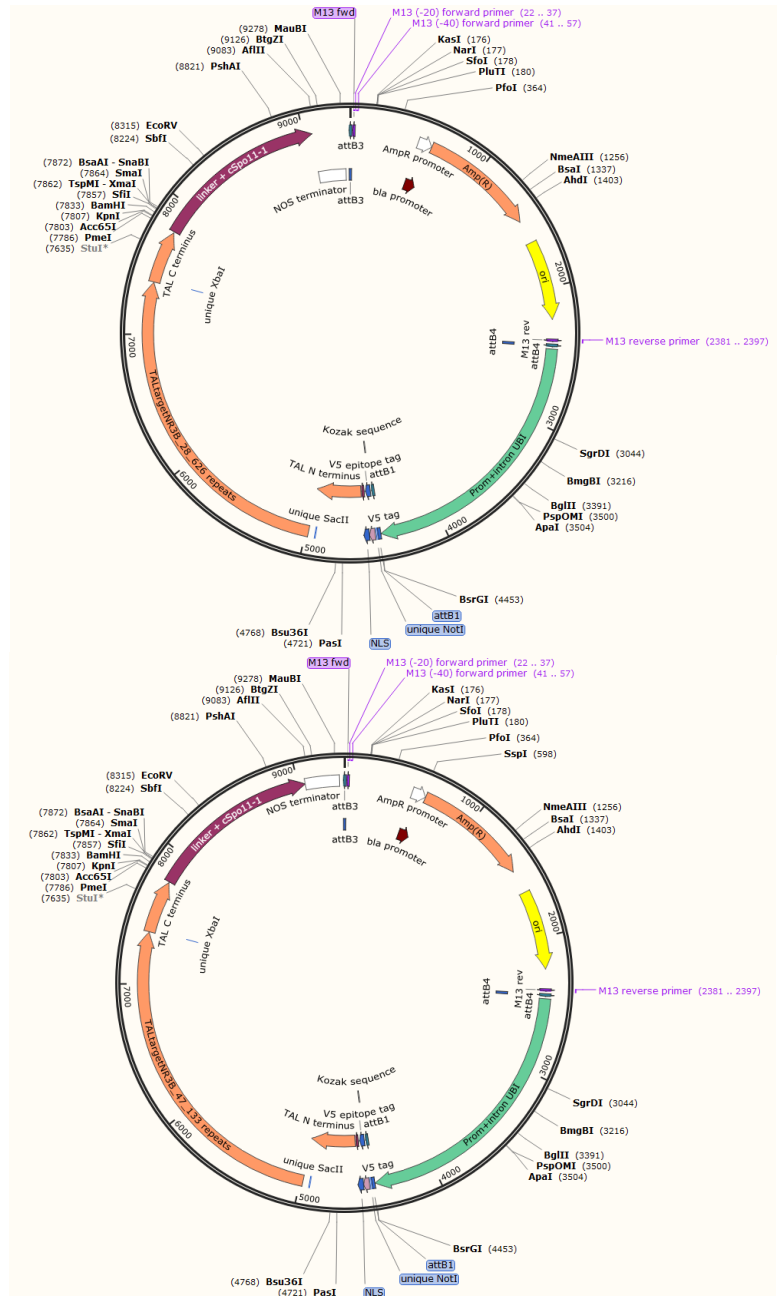
TAL47-SPO11-1



TAL15-SPO11-2



TAL28-cSPO11-1



TAL47-cSPO11-2

Annexe 2 : Compositions des milieux de culture *in vitro* :

Milieu plasmolysant :

Maltose	50g
Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	2,2g
Agar	4g
Thiamine HCl	0,02g
Asparagine	0,075g
qsp eau osmosée	500mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
2-4D filtré (1mg/mL)	1,25mL

Milieu de callogenèse MSE3 :

Saccharose	60g
Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	4,4g
Agar	8g
Thiamine HCl	0,04g
Asparagine	0,15g
qsp eau osmosée	1000mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
2-4D filtré (1mg/mL)	2,5mL

Milieu de régénération et sélection PM11 :

Saccharose	5g
Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	4,4g

Agar	8g
Thiamine HCl	0,04g
Asparagine	0,15g
qsp eau osmosée	1000mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
IAA filtré (1mg/mL)	0,5mL
BAP filtré (1mg/mL)	1mL
Mannose (solution mère à 0,5g/mL)	20mL

Milieu de régénération et sélection PMI2 :

Saccharose	20g
Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	4,4g
Agar	8g
Thiamine HCl	0,04g
Asparagine	0,15g
qsp eau osmosée	1000mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
IAA filtré (1mg/mL)	0,5mL
BAP filtré (1mg/mL)	1mL
Mannose (solution mère à 0,5g/mL)	10mL

Milieu de régénération et sélection PMI3 :

Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	4,4g
Agar	8g

Thiamine HCl	0,04g
Asparagine	0,15g
qsp eau osmosée	1000mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
IAA filtré (1mg/mL)	0,5mL
BAP filtré (1mg/mL)	1mL
Mannose (solution mère à 0,5g/mL)	30mL

Milieu d'enracinement MSO PMI :

Milieu MS micro et macro éléments + vitamines	2,2g
Agar	8g
qsp eau osmosée	1000mL
Faire le pH à 5,7 et autoclaver	
IAA filtré (1mg/mL)	1mL
Mannose (solution mère à 0,5g/mL)	30mL

Annexe 3 : Amorces PCR utilisées

Name	Sequence	Taille (pb)	TM (°C)	but
PMI-1 forward	GCACAGCCACTCTCCATTCA	20	60	génotypage transgène sélection
PMI-2 reverse	ATCGGAGTTTGCCATCACTTC	21	60	génotypage transgène sélection
TAL_C-ter_F	GGACTGCCTCACGCCCTGTC	20	60	génotypage transgène TAL
linker-Spo11_R	CGCCATACGTATGCCCG	17	60	génotypage transgène TAL
WMS257R	CCAAGACGATGCTGAAGTCA	20	60	contrôle amplification
	CACGACGTTGTAAAACGACAGAG			
WMS257L-M13	TGCATGGTGGGACG	37	60	contrôle amplification
	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAC			
cfn1936783_C	TTTGCTCGTGTGGTGGTC	41	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAC			
cfn1936783_T	TTTGCTCGTGTGGTGGTT	41	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
cfn1936783_commune	TTCCGCTGGGGTCCCTGG	18	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGA			
cfn0108244_C	GAGCCTATCAATCTACATTTCC	45	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGA			
cfn0108244_T	GAGCCTATCAATCTACATTTCT	45	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
cfn0108244_commune	CTCAACGCTTGATGGCTCAC	20	60	Génotypage KASPar population T1 TAL28
	GTCGGTctccgcaccggaccggc			
Sonde 15-412 F	gtcgccaactGCCCTCAC	40	60	EMSA
	GTGAGGGCagtggcgacgcccgt			
Sonde 15-412 R	ccggtgcggaGACCGAC	40	60	EMSA
	CAACTTTtgagcagccggcaga			
Sonde 28-626 F	cgccgtctgCACAGCCC	40	60	EMSA
	GGGCTGTGcagacggcgtctgcc			
Sonde 28-626 R	ggcgtgctcaAAAGTTG	40	60	EMSA
	CACCCGCTcgcgcccggcccgt			
Sonde 47-133 F	gcccgaactGTTCCGCT	40	60	EMSA
	AGCGGAACagtggcggcaccggcg			
Sonde 47-133 R	ggccgcgcggaGCGGGTG	40	60	EMSA
Spo11-2 exon1 F	GGACGTACCCGCAACCTC	18	60	Epissage
Spo11-2 exon2 R	GCCGGAGAAGAGGGAGAC	18	60	Epissage
Spo11-2 exon2 F	ACGCTCTCGTCTCCCTCTTC	20	60	Epissage
Spo11-2 exon3 R	AATGCCTTGGCATCATTTTC	20	60	Epissage
Spo11-1 exon1 F	CCTGCTCCTCCACAAGATCA	20	60	Epissage
Spo11-1 exon2 R	GGCGCAGTAGTTCTGGTAGC	20	60	Epissage
Spo11-1 exon2 F	GCTCCACCGCTACCAGAAC	19	60	Epissage
Spo11-1 exon3 R	CTTGCGGAGGAGGGAGAG	18	60	Epissage
CrispSeq15_R	AAGGGATGGGGTGGGAC	18	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq15_F1	CTAAACCTGACCCACCACC	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq15_F2	ACCCACCACCACGCCAAC	18	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq28_R	GAGGGAGTAGTCGATAGTGA	20	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq28_F	CCGACCGAAGAGACGCCA	18	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq47_R	CTGCTGCTGCGAATGCTGC	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq47_F	CAAAAACAAGGTGGCGTGTCA	20	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq01_F1	GGGGTGAAAAGACGGCGAGT	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq01_F2	AGATTGAGGGAGGTGCGCT	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq01_F3	GCTGACGGCTGCGGACTT	18	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq12_F	AGACCCAGACCCAGACCC	18	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq14_F	CCTAGCAATGCCTGGATGG	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq14_R	CCTATGGCAAGCAGCAGAG	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq01_R1	CAGGGACACATGGCACTCA	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq01_R2	GCCGACGAATCAAAGCCCA	19	60	criblage mutation CRISPR
CrispSeq12_R	GTTGGGGGAATGGAGGGA	18	60	criblage mutation CRISPR
Cas9KE_F	GGCAAATCACCAAGCACGTT	20	60	génotypage transgène Cas9 ou dCas9
Cas9KE_R	TCTTGACGATGTTGACTTGTG	21	60	génotypage transgène Cas9 ou dCas9
6gRNAguides-Re-NRe_F	GAAGGTCTAGAGTTTTAGAGC	21	60	génotypage transgène guide CRISPR
6gRNAguides-Re-NRe_R	GCTCTAAAACCGCTTCGCC	19	60	génotypage transgène guide CRISPR

Annexe 4 : Genotypage de marqueurs ISBP : analyse en courbe de dissociation.

Mode opératoire		
	<u>GENOTYPAGE DE</u>	Réf : MO-MOL-135 Version date : 29/08/2011 page 1/5
	<u>MARQUEURS ISBP</u>	
	<u>ANALYSE EN COURBE</u>	
	<u>DE DISSOCIATION</u>	

1. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit les étapes pour réaliser une PCR avec des marqueurs ISBP en condition SYBR Green en plaque 384 puits en vue d'une analyse en courbe de dissociation sur l'appareil ABI PRISM 7900HT Applied Biosystems.

2. Documents de référence

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

4. Hygiène et sécurité

Porter une blouse. Manipuler le SYBR Green (agent intercalant de l'ADN) avec des gants en nitrile.

Evacuer les déchets liquides et solides contaminés par le SYBR Green dans un seau blanc avec couvercle prévu à cet effet.

5. Principe de la méthode

La PCR réalisée se fait selon le même protocole que la PCR classique mais en ajoutant du SYBR Green, un agent fluorescent marquant spécifiquement les doubles brins d'ADN (fixation dans le grand sillon de la double hélice d'ADN) il n'y a donc pas de fluorescence lorsqu'il est en solution.

Nous utilisons un programme PCR en « touch-down » qui consiste à avoir une température d'hybridation très haute lors des premiers cycles afin d'assurer une forte stringence et donc une amplification spécifique. Une fois que la séquence d'intérêt devient majoritaire, la température d'hybridation est progressivement abaissée (-1°C par cycle) afin d'assurer une meilleure efficacité de la PCR.

Les résultats de cette amplification PCR sont analysés à l'aide d'un appareil de PCR quantitative (ABI PRISM 7900HT). Ce dernier permet de suivre l'intensité de fluorescence du SYBR Green dans chaque puits en temps réel au cours d'une augmentation progressive de température et ainsi d'établir une courbe de dissociation des produits d'amplification de chaque puits.

Le protocole de dissociation est le suivant :

- étape préliminaire : dissociation-renaturation des produits d'amplification en augmentant la température à 95°C puis en diminuant jusqu'à 60°C. Cela permet l'obtention de produits PCR correctement renaturés sous leur forme double brin.

- étape suivante : augmentation progressive de la température, de 0,7°C toutes les 15 secondes, de 60°C à 95°C. Lors de cette étape les produits d'amplification PCR se dissocient lorsque la température de l'appareil atteint leur température de fusion (T_m). L'ADN n'est plus sous forme double brin, le SYBR Green se retrouve en solution et on observe donc une diminution brutale de la fluorescence.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Karine PAUX	Christel LAUGIER	<i>Responsable d'équipe &/ou Responsable AQR</i>
Fonction :	Assistante Ingénieur	AI	
Visa :			

Mode opératoire



GENOTYPAGE DE MARQUEURS ISBP ANALYSE EN COURBE DE DISSOCIATION

Réf : MO-MOL-135

Version
date : 29/08/2011
page 2/5

La T_m étant différente selon la taille et la séquence du fragment d'ADN, les fragments différents ne se dissocient pas à la même température et donc la diminution de la fluorescence n'a pas lieu au même moment. Les profils des courbes obtenues sont donc différents. L'appareil mesure l'intensité de fluorescence tout au long de cette dernière étape, et fournit des données numériques et graphiques permettant de détecter à quelle température chaque produit PCR se dissocie.

6. Matériels nécessaires

- Plaques PCR 384 puits
- Films transparents
- Film aluminium
- Tubes pour le mix
- Tubes eppendorf
- Pipettes et pointes correspondantes avec et sans filtre
- Centrifugeuse
- Thermocycleur
- ABI PRISM 7900HT Applied Biosystems.
- Robots pipeteurs
- Bac de glace

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

- ADN génomique
- Amorces ISBP (cfp) gauche et droite – solutions mères à 100 μ M
- dNTP – solution mère à 100 mM
- Tampon 10X contenant 31 mM de $MgCl_2$
- Bétaine 5M
- SYBR Green – solution de travail à 1,6 X préparée à partir de la solution diluée à 100 X elle-même préparée à partir de la solution mère à 10 000X (sous hotte acrylamide plateforme)
- ADN Taq Polymérase
- H_2O ultra pure

8. Contraintes de la méthode

Préparer le mix des amorces à 10 μ M et le mix de dNTP 10mM à l'avance.

Laisser décongeler la solution de SYBR Green à l'abri de la lumière. Ne pas recongeler les tubes après utilisation.

Réserver les blocs du thermocycleur.

Réserver l'ABI PRISM 7900HT et l'allumer environ 15 minutes avant utilisation.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Karine PAUX	Christel LAUGIER	<i>Responsable d'équipe &/ou Responsable AQR</i>
Fonction :	Assistante Ingénieur	AI	
Visa :			

Mode opératoire



**GENOTYPAGE DE
MARQUEURS ISBP
ANALYSE EN COURBE
DE DISSOCIATION**

Réf : MO-MOL-135

Version
date : 29/08/2011
page 3/5

9. Contenu du mode opératoire

Réalisation de la réaction PCR – travail dans la glace

- Préparer les dilutions d'échantillon d'ADN à 10 ng/μL dans de l'eau ultra pure (ou tampon TE 0,1X)
- Distribuer 2,5 μL d'ADN de chaque échantillon dans des plaques PCR 384 puits (possibilité d'utiliser le robot Biomek FX)
- Couvrir avec un film aluminium
- Centrifuger en mode pulse
- Préparer un mix d'amorces à 10μM à partir de la solution mère à 100μM en utilisant les pointes à filtre
- Préparer un mix de dNTP à 10mM à partir des solutions mères à 100mM
- Préparer le mix d'amplification PCR en respectant les volumes suivants :

PRODUITS	1 réaction
ADN à 10 ng/μL	2,5 μL
Tampon 10X (contenant 31mM MgCl ₂)	1 μL
Bétaine 5M	2 μL
dNTP10mM	0,4 μL
Amorces G + D 10μm	0,5 μL
ADN Taq polymérase	0,25 μL
SYBR Green 1,6X	1 μL
H ₂ O up stérile qsp 7,5 μL	2,35 μL
VOLUME TOTAL	10 μL

! Manipuler le SYBR Green avec des gants en nitrile.

- Distribuer 7,5 μL de mix d'amplification PCR et amorces sur les échantillons d'ADN (possibilité d'utiliser le robot Biomek 3000)
- Réaliser des témoins d'amplification négative en remplaçant l'ADN par de l'eau
- Appliquer un film transparent sur la plaque en prenant soin qu'il adhère bien pour éviter les évaporations
- Centrifuger en mode pulse
- Lancer le programme PCR suivant :

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Karine PAUX	Christel LAUGIER	
Fonction :	Assistante Ingénieur	AI	
Visa :			<i>Responsable d'équipe &/ou Responsable AQR</i>

Mode opératoire



**GENOTYPAGE DE
MARQUEURS ISBP
ANALYSE EN COURBE
DE DISSOCIATION**

Réf : MO-MOL-135

Version
date : 29/08/2011
page 4/5

Programme CFP

95°C 5min

7X { 95°C 30s
62°C 30s -1°C par cycle
72°C 30s

31X { 95°C 30s
55°C 30s
72°C 30s

11X { 95°C 30s
56°C 30s
72°C 30s

72°C 5min
15°C for ever

- Centrifuger la plaque en mode pulse

Analyse en courbe de dissociation

Lancement d'un run :

- Allumer l'appareil ABI PRISM 7900HT. Compter 15 minutes de préchauffage
- Ouvrir la session Ugenotypage - mot de passe LabGen0type1
- Ouvrir le logiciel SDS
- Créer un nouveau fichier, cliquer sur « file -> new »
- Sélectionner les paramètres suivants :
 - Assay : Absolute quantification (standard curve)
 - Container : 384 wells clear plate
 - Template : Dissociation curve ISBP
- Valider le choix en cliquant sur OK pour accéder à la feuille de route
- Dans l'onglet Instrument, sélectionner le mode standard (décocher 9600 émulation)
- Indiquer le volume de la réaction (10µL en général)

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Karine PAUX	Christel LAUGIER	
Fonction :	Assistante Ingénieur	AI	
Visa :			<i>Responsable d'équipe &/ou Responsable AQR</i>

Mode opératoire



GENOTYPAGE DE MARQUEURS ISBP ANALYSE EN COURBE DE DISSOCIATION

Réf : MO-MOL-135

Version
date : 29/08/2011
page 5/5

- Sauvegarder l'essai. Sous le menu « *File* » choisir « *Save* » et entrer le nom de la plaque
- Connecter l'appareil en cliquant sur « *Connect* » dans l'onglet instrument
- Cliquer sur « *open/close* » pour faire sortir le portoir
- Placer la plaque sur le portoir en mettant le puits A1 en haut à gauche
- Cliquer sur « *close* » pour faire rentrer le portoir
- Lancer le Run en cliquant sur « *Start* »

Analyse des données :


- A la fin du Run, sélectionner l'ensemble des puits en cliquant en haut à gauche du dessin de la plaque
- Dans l'onglet Setup, cocher la case du détecteur SYBR Green
- Pour lancer l'analyse des résultats, cliquer sur la flèche verte dans la barre de tâche
- Enregistrer en cliquant sur l'icône disquette
- Pour visualiser les courbes de dissociation, se placer sous l'onglet Dissociation Curve
- Sélectionner les différents puits pour visualiser la courbe

Analyse en électrophorèse

- Rajouter 2,5 µL de rouge de crésol dans chaque puits
- Déposer sur un gel 0,8 % d'agarose dans du tampon TE1X

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Karine PAUX	Christel LAUGIER	
Fonction :	Assistante Ingénieur	AI	<i>Responsable d'équipe &/ou Responsable AQR</i>
Visa :			

Annexe 5 : Protocole KASPar

	MODE OPERATOIRE GENOTYPAGE SNP PAR LA CHIMIE KASPAR EN PLAQUE 384, LECTURE AU LC480	Version : 5 date : 23/06/2015 Page 1 sur 5
---	--	---

Version	Date	Modifications
1	02/08/11	Création
2	04/07/13	Ajout paragraphe Analyse des résultats et suppression du logo Jean Perrin
3	28/03/14	Modification du tableau de préparation des mix
4	18/03/15	Modification du paragraphe « Préparation et distribution du mix PCR »
5	26/06/15	Ajout conservation mix Assay dans le paragraphe 5.2

1. Objet

Ce mode opératoire définit l'ensemble des étapes à respecter, pour réaliser du génotypage en plaque 384 à partir de marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism), via la chimie KASPar. La lecture de fluorescence est réalisée sur le LightCycler® 480 (LC480) de Roche, en point final.

2. Matériels

- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white (04 729 749 001)
- Plaque PCR96 Biorad (réf : HSS9601)
- LightCycler® 480 Sealing Foil, (04 729 757 001)
- Film aluminium autocolant (DUTSCHER, réf. 106570)
- Robot Hamilton Microlab Star
- Robot Beckman Coulter Biomek®3000
- Thermocycler Veriti 384 Well (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 II (LC480), Roche
- Microtube 1,5 ml (DUTSCHER, réf.034013)

3. Réactifs chimiques et biologiques

- KASPar v4.0 2X Reagent Mix Low Rox (LGC Genomics, KBS-1016-017), stocké à -20°C
- MgCl₂ 50mM, LGC Genomics, stocké à -20°C
- H₂O milliQ

4. Contraintes de la méthode

- L'ADN doit être dosé et normalisé à une concentration finale de **10ng/μl** et réparti dans des plaques 96 PCR ou des plaques 96 Storage de 0,8mL.
- Les manipulations pré-PCR se déroulent en salle « mix », et les manipulations post-PCR, en salle « séquenceur ».
- Penser à réserver les appareils sur les plannings.


5. Contenu du mode opératoire

5.1 Répartition de l'ADN en plaque 384

Répartir, avec le robot de pipetage Hamilton Star, **2μL** d'ADN à 10ng/μl, dans les plaques 384 PCR (blanches) selon l'ordre de distribution suivant: A1, B1, A2, B2.

Les plaques doivent être centrifugées et scellées si nécessaire avec du film aluminium autocollant.

Rédigé par : Véronique Gautier	Modifié par : Lydia Jaffrelo	Approuvé par : Charles Poncet
Signature  GAUTIER GDEC ID <small>Signature numérique de Veronique GAUTIER GDEC ID DN: c=FR, ou=INRA, ou=GDEC, cn=Veronique GAUTIER GDEC ID Date: 2016.02.04 14:07:44 +01'00'</small>	Signature  LYDIA JAFFRELO GDEC ID <small>Signature numérique de Lydia JAFFRELO GDEC ID DN: c=FR, ou=INRA, ou=GDEC, cn=Lydia JAFFRELO GDEC ID Date: 2016.01.28 08:40:11 +01'00'</small>	Signature  CHARLES PONCET GDEC ID <small>Signature numérique de Charles PONCET GDEC ID DN: c=FR, ou=INRA, ou=GDEC, cn=Charles PONCET GDEC ID Date: 2016.01.28 08:40:42 +01'00'</small>

	MODE OPERATOIRE GENOTYPAGE SNP PAR LA CHIMIE KASPAR EN PLAQUE 384, LECTURE AU LC480	Version : 5 date : 23/06/2015 Page 2 sur 5
---	--	---

5.2 Préparation et distribution du mix PCR

- Préparation des « assays mix » (mix de primers) :

Pour 100µl d'assay mix :

- 12 µL d'amorce spécifique de l'Allele 1 (100µM) → 12 µM final
- + 12 µL d'amorce spécifique de l'Allele 2 (100µM) → 12 µM final
- + 30 µL d'amorce spécifique de common (100µM) → 30 µM final
- + 46 µl d'H₂O mQ

Les assay mix sont préparés dans du TE lowEDTA puis conservés au maximum 2 mois au congélateur.

- Les mix PCR sont préparés en microtube de 1,5 ml puis sont distribués en plaque 96. Le tableau suivant référent les volumes ainsi que la disposition en plaque (volume mort compris) :

Le mix KASPar possède une concentration de 1,8mM en MgCl₂, lorsque le pourcentage en GC des assays KASPar est trop faible, il faut alors rajouter du MgCl₂ dans le mix :


si % GC entre 33% et 55% → 2,2 mM MgCl₂ final

si % GC < 33% → 2,5 mM MgCl₂ final

NB : Le mix de chaque marqueur est placé sur une colonne de la plaque 96 PCR. Ex : le programme « 1mker/quart » nécessite 4 colonnes de la plaque 96 PCR (4 mix) alors le programme 2 mkers/plaque nécessite 2 colonnes de la plaque 96 PCR (2 mix). Le programme « 1mker/plaque » nécessite 2 colonnes composé du même mix (1mix).

			1mker/quart	2mkers/plaque	1mker/plaque		
KasparLC480		support distribution	PCR96	PCR96	PCR96, 2 colonnes		
		nombre d'individus	1	140	256	490	
	1.8 mM de MgCl ₂		Master Mix 2X	2	280	512	980
			assay mix	0.055	7.7	14.08	26.95
			volume total	2.055	287.7	526.08	1006.95
			volume à distribuer/puits		30	58	58
			ADN	2	280	512	980
	2.2 mM de MgCl ₂		Master Mix 2X	2	280	512	980
			assay mix	0.055	7.7	14.08	26.95
			MgCl ₂	0.032	4.48	8.192	15.68
			volume total	2.087	292.18	534.272	1022.63
			volume à distribuer/puits		30	58	58
		ADN	2	280	512	980	
	2.5 mM de MgCl ₂		Master Mix 2X	2	280	512	980
			assay mix	0.055	7.7	14.08	26.95
			MgCl ₂	0.056	7.84	14.336	27.44
			volume total	2.111	295.54	540.416	1034.39
			volume à distribuer/puits		30	58	58
	ADN	2	280	512	980		

- Les mix sont distribués dans les plaques 384 PCR (blanches) contenant l'ADN avec le Biomek 3000. Les programmes sont localisé dans le répertoire « Formation » du logiciel « Biomek Software ». Choisir le programme adapté au nombre de marqueurs par plaque.

	MODE OPERATOIRE GENOTYPAGE SNP PAR LA CHIMIE KASPAR EN PLAQUE 384, LECTURE AU LC480	Version : 5 date : 23/06/2015 Page 3 sur 5
---	--	---

- Les plaques doivent être scellées avec les films préconisés pour le LC480.

5.3 PCR


L'amplification est réalisée sur les thermocycleurs avec le programme suivant, nommé «Projet extérieur KASPar» :

94°C → 15 min	
94°C → 20 s	} x 10cycles, -0.8°C/cycle
65°C → 1 min	
94°C → 20 s	} x 40cycles
57°C → 1 min	
15°C → ∞	

Après lecture au LC480, si cela semble nécessaire (intensité de fluorescence trop faible), il est possible de relancer des cycles d'amplification avec le programme suivant : « Projet extérieur KASPar 3recycles»

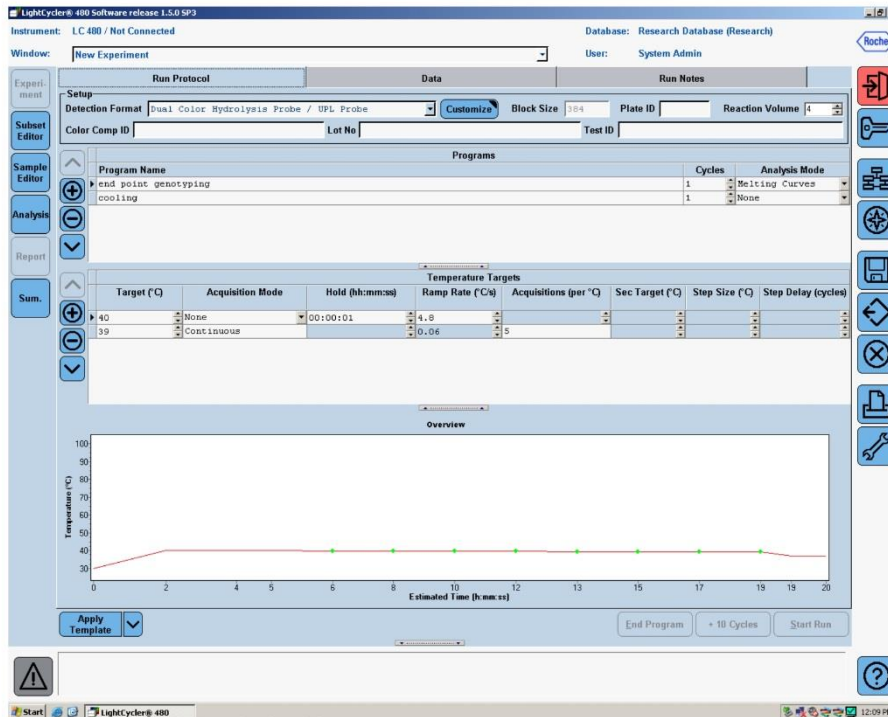
94°C → 15 min	
94°C → 10 s	} x 3cycles
57°C → 1 min	
15°C → ∞	

5.4 Lecture au LC480

 Avant d'insérer la plaque dans le LightCycler® s'assurer que le voyant de droite est orange (si les 2 voyants sont verts, une lecture est en cours)

- Ouvrir le logiciel « LightCycler® 480 SW 1.5 »
- User name : admin et MDP : LightCycler 480- Cliquer sur « New experiment from template »
- Puis sélectionner le Run template : « Lecture Kaspar Plateforme »

Le protocole de lecture est le suivant :



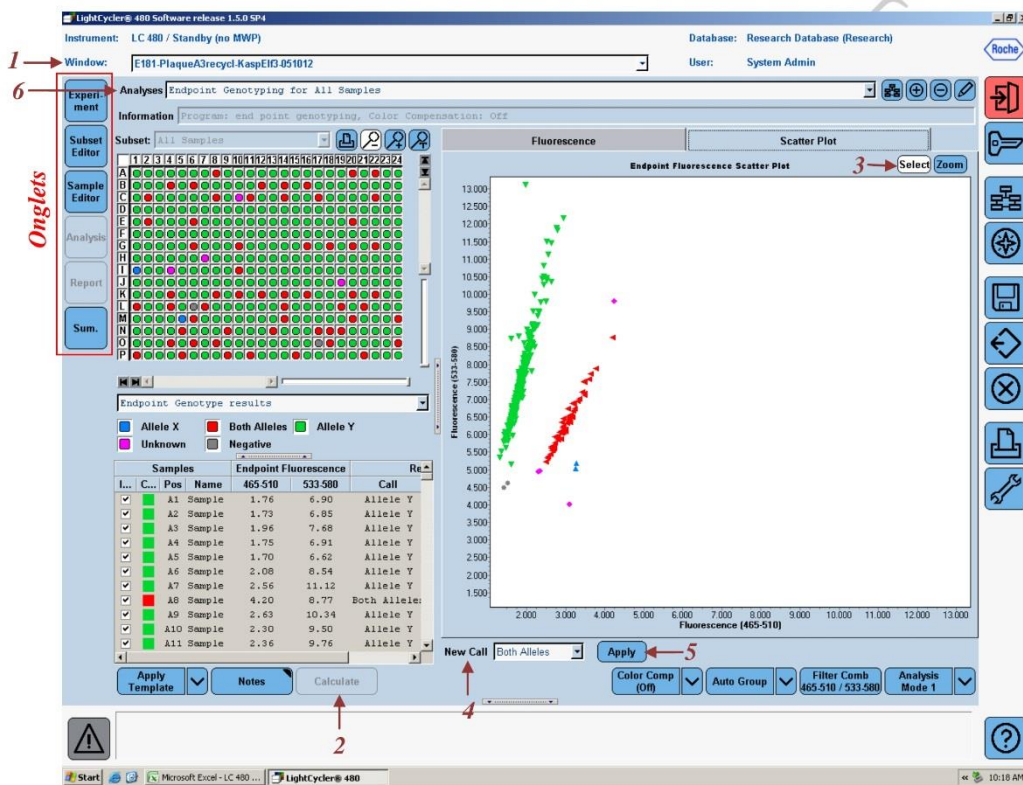
- Ouvrir la porte du LightCycler® en appuyant sur le bouton avec les 2 flèches et mettre la plaque, refermer en appuyant de nouveau sur le bouton
- Puis « Start Run » et renseigner le nom de la plaque ainsi que le dossier dans lequel le fichier sera stocké.

La lecture dure moins d'une minute.

5.5 Analyse des résultats

- Ouvrir le logiciel « LightCycler® 480 SW 1.5 »
- User name : admin et MDP : LightCycler 480
- Dans la ligne « Window » (*I*) choisir « Navigator » et rechercher le fichier. Si le fichier n'est pas stocké ici, cliquer sur le bouton « Import » et rechercher le fichier
- Dans l'onglet « Subset Editor » on peut créer différents subset (=zone d'analyse). Pour cela, cliquer sur le bouton « + », nommer le subset, sélectionner les puits concerné et cliquer sur le bouton « Apply »
- Dans l'onglet « Sample Editor », on peut coller la liste des individus (copier coller à partir d'un fichier excel) en faisant bien attention à l'ordre

- Dans l'onglet « Analysis », cliquer sur « end point genotyping » et choisir le subset. Une fois le graph apparu, cliquer sur le bouton « Calculate » (2)
- Pour modifier le graph, cliquer sur « Select » (3) et entourer les points à modifier, puis dans la ligne « New Call » (4) choisir la nouvelle assignation de la sélection et cliquer sur « Apply » (5)
- Pour analyser un autre subset sur le même run, choisir « Overview » dans la ligne « Analyses » (6) et relancer l'analyse
- Pour analyser un autre run, choisir « Navigator » dans la ligne « Window » (1) et recommencer l'analyse



Annexe 6 : Contigs dans lesquels sont contenus les gènes Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre

Spo11-1-5A :

>5AL_2686861 6212 89232 656300-,1329145+

Spo11-1-5B :

>5BL_10897570 18438 350801 9137197+,...,10725867+

Spo11-1-5D :

>5DL_934837 12243 404669

Spo11-2-7A :

>7AL_4436538 14778 234459 350761-,...,3798250+

Spo11-2-7B :

>7BL_6547054 1085 5900 2717944-,5747744-,2922732-

>7BL_6685333 2200 12894 3306271+,...,5402843-

Spo11-2-7D :

>7DL_3344379 10321 335407 1345348+,...,209633-

Annexe 7 : Séquences CDS et protéique des Spo11-1 et Spo11-2 de blé tendre. Les espaces dans les séquences correspondent aux gaps générés lors de l'alignement.

Spo11-1-5A :

CDS:

```
ATGGCGGGGAGTGGGAAGAGGAGGCGCGCGACGGTGCTCGACGACGACGAGCGGGCGGGGG
CGGCGGAGGCTGGAGGAGGCGGCCCTGCTCCTCCACAAGATCAAAGGGCTGGTGGGCTGG
GTGGTCGCGGAGGTCAGCGCCGGCCGATCCCCTTCCCTGGCTCTCCACCGCTACCAGAAC
TACTGCGCCTGCGCCTCCGCCGCGCCGCCGCGCTCCCTGTCCACATGCGCCTGCAGC
TACGACGCCCCCGTGGCAGGACGTCTCTCCCTCCTCCGCAAGGAATTCACGCCTCC
CGACTCAATGTGCTTCTCAGGGTCCTGCTCGTGGTGCAGCAACTCCTGCAGGAGAATAAG
CACTGCTCCAAGAGGGACATCTACTACATGTACCCCTCCATGTTTCGTAGAACAAGCGATT
GTTGATCGTGCCATCAATGATATCTGCATACTCTTCAAGTGCAGCCGGCATAATCTCAAC
GTGGTTCCCTGTGGCAAAGGTTTGGTGATGGGCTGGATAAGATTTGTGGAGGGTGAAAAG
AAAGTGTATTGTATAACAAACGTCAATGCTGCTTCCCCATTCCAGTTAGCATTGAGGCA
ATCAAAGATGTTGTTAGTGTTGCTCACTACATCCTTGTGTTGAGAAGGAGGCAGTGTTT
CAGCGTTTGGCCAATGACAAGTTCTGCGAAAAGAATCGCTGCATTGTTATTACAGGAAGA
GGCTACCCAGATATTCACAAGAAGATTCTTGCCTACCTTGTGCAACAGCTGCACTTG
CCTGCTTATTGCTTAGTGGATTTCAGATCCGTATGGTTTTGATATTCTGGCTACCTATAAA
TTTGGTTCCATGCAATTGGCATAATGATGCAAATGTTCTGCGTGTGCCTGAGATACGATGG
CTTGGGGTCTTCACATCTGACTTTGAGGAGTATTGTCTTCCAGACTGCTGTCAGCTTCAA
TTGTATCTGAAGATAGGAGGAAGCTTGAAGGAATTCTAACCAGATGTTACTTGCACAAG
GAAGCCCCAGAATGGAGGTTGAAGTTGGAAGCCATGCTGGAAATGGGTGTCAAGTTTGAG
ATTGAAGCATTGTCAGCAAGTTCCATTTCTGTTCTGTCGCAAGAGTACATCCCCAACAG
ATCAGGCTAGGGAGGTATATATAG
```

Protéine :

```
MAGSGKRRRATVLDDDERRRRLEEAALLLHKIKGLVGVVVAEVSAGRSPSLALHRYQN
YCACASAAAAAASLSTCACSYPDAPVGTDLVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLQENK
HCSKRDIYYMYPMSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEK
KVYCITNVNAAFPPIPVSIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCENRCIVITGR
GYPDIPTRRFLRYLVEQLHLPAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRW
LGVFTSDFEYCLPDCCLQLSSEDRRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVGFKE
IEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI
```

Spo11-1-5B :

CDS:

```
ATGGCGGGGAGTGGGAAGAGGAGGCGCGCGACGGTGCTCGACGACGACGAGCGGGCGGGGG
CGGCGGAGGCTGGAGGAGGCGGCCCTGCTCCTCCACAAGATCAAAGGGCTGGTGGGCTGG
GTGGTCGCGGAGATCAGCGCCGGCCGATCCCCTTCCCTGGCGCTCCACCGCTACCAGAAC
TACTGCGCCTGCGCCTCCGCCGCGCCGC~~~GGCGTCCCCGTCCACATGCGCCTGCAGC
TACGACGCCCCCGTGGCAGGACGTCTCTCCCTCCTCCGCAAGGAATTCACGCCTCC
CGCTCAATGTGCTTCTCAGGGTCCTGCTCGTGGTGCAGCAGCTCCTGCAGGAGAATAAG
CACTGCTCCAAGAGGGACATCTACTACATGTACCCCTCCATGTTTCGTAGAACAAGCGATT
GTTGATCGTGCGATCAACGATATCTGCATACTCTTCAAGTGCAGCCGGCATAATCTCAAC
GTGGTTCCCTGTGGCAAAGGTTTGGTGATGGGCTGGATAAGATTTGTGGAGGGTGAAAAG
AAAGTGTACTGCATAACAAACGTCAATACTGCTTCCCCATTCCAGTTAGCATTGAAGCA
```

ATCAAAGATGTTGTTAGTGTTGCTCACTACATCCTTGTGTTGAGAAGGAGGCAGTATTC
CAGCGTTTGGCCAATGACAAGTTCTGCGAAAAGAATCGCTGCATTGTTATTACAGGAAGA
GGCTACCCAGATATTCACAAGAAGATTCTTGCGCTACCTTGTGCAACAGCTGCACTTG
CCTGCTTATTGCTTAGTGGATTTCAGATCCGATGGTTTTGATATTCTGGCCACCTATAAA
TTTGGTTCCATGCAATTGGCATAATGATGCAAATATTCTGCGTGTGCCTGAGATACGATGG
CTTGGGGTCTTCACATCTGACTTTGAGGAGTATTGTCTTCCAGACTGCTGTCAACTTCAA
TTGTCATCTGAAGATAGGAGGAAGCTTGAAGGAATTCTCACCAGATGTTACTTGCACAAG
GAAGCCCCAGAATGGAGGTTGAAGTTGGAAGCCATGCTGGAAATGGGTGTCAAGTTTGAG
ATTGAAGCATTGTCAGCAAGTTCCATTTTCGTTTCTGTGCGCAGGAGTACATCCCCAACAG
ATCAGACTAGGGAGGTACATATAG

Protéine :

MAGSGKRRRATVLDDDERRGRRLLEEAALLLHKIKGLVGVVVAEISAGRSPSLALHRYQN
YCACASAAAAASPSTCACSYDAPVGTDLVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLQENKH
CSKRDIYYMYPMSFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKK
VYCITNVNTAFPIPVSIKIDVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRG
YDPDIPTRRFLRYLVEQLHLPAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANILRVPEIRWL
GVFTSDFEYCLPDCCLQLSSEDRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMGVKFEI
EALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI

Spo11-1-5D :

CDS:

ATGGCGGGGAGTGGGAAGCGGAGGCGCGACGGTGTCTGACGACGACGAGCGGCGGGGG
CGGCGGAGGCTGGAGGAGGCGGCCCTGCTCCTCCACAAGATCAAAGGGCTGGTGGGCTGG
GTGGTTCGCGGAGATCAGCGCCGGCCGATCCCCTTCCCTGGCGCTCCACCGCTACCAGAAC
TACTGCGCCTCCGCCGACGCCGCCGCCGCCGCGTCCCCGTCCACATGCGCCTGCAGC
TACGACGCCCCCGTCCGACGGACGTCCCTCTCCCTCCCGCAAGGAATCCACGCTTCC
CGCTCAATGTGCTTCTCAGGGTCTGCTCGTGGTGCAGCAACTCCTGCAGGAGAACAAG
CACTGCTCCAAGAGGGACATCTATTACATGTACCCCTCCATGTTTCGTAGAACAAGCGATT
GTTGATCGTGCCATCAACGATATCTGCATACTCTTCAAGTGCAGCCGGCATAATCTCAAC
GTGGTTCCTGTGGCAAAGGTTTGGTGTGATGGGCTGGATAAGATTTGTGGAGGGTGAAGAAG
AAAGTGTATTGTATAACAAACGTCAATGCTGCTTCCCCATTCCAGTTAGCATTGAGGCA
ATCAAAGATGTTGTTAGTGTTGCTCACTACATCCTTGTGTTGAGAAGGAGGCAGTGTTTC
CAGCGTTTGGCCAATGACAAGTTCTGCGAAAAGAATCGCTGCATTGTTATTACAGGAAGA
GGCTACCCAGATATTCACAAGAAGATTCTTGCGCTACCTTGTGCAACAGCTGCACTTG
CCTGCTTATTGCTTAGTGGATTTCAGATCCATATGGTTTTGATATTCTGGCCACCTATAAA
TTTGGTTCCATGCAATTGGCATAATGATGCAAATGTTCTGCGTGTGCCTGAGATACGATGG
CTTGGGGTCTTCACATCTGACTTTGAGGAGTATTGTCTTCCGGACTGCTGTCAATTACAA
TTGTCATCTGAAGATAGGAGGAAGCTTGAAGGAATTCTCACCAGATGTTACTTGCACAAG
GAAGCCCCAGAATGGAGGTTGAAGTTGGAAGCCATGCTGGAAATGGGTGTCAAAATTTGAG
ATTGAAGCATTGTCAGCAAGTTCCATTTTCGTTTCTGTGCGCAAGAGTACATCCCCAACAG
ATCAGACTAGGGAGGTACATATAG

Protéine :

MAGSGKRRRATVLDDDERRGRRLLEEAALLLHKIKGLVGVVVAEISAGRSPSLALHRYQN
YCASADAAAAASPSTCACSYDAPVGTDLVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLQENKH
HCSKRDIYYMYPMSFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEK

KVYCITNVNAAFP I PVSIEAIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGR
GYPDIPTRRFLRYLVEQLHLPAYCLVDSDPYGF DILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRW
LGVFTSDFEYCLPDCQQLLSSEDRRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVGF
IEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI

Spo11-2-7A :

CDS:

ATGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGACGTGCCCGCGGCCTCGCTCTTCGGTGCGGACCGC
CGCCTCTGCTCAGCCGACATGCTCTCGCCGCCGAGATT-----

~::~~
~::-----TCCCGCAAGTCCACCAATTGCAGCCTGCGCAGCGGCTTGCTGAGCGATGTTTCA
TCGGTTTATCTGTCCTACGCCTTTTGAAGAGGTCCTAATGAGAGAAAATGATGCCAAG
GCATTCGTCAGAGTATGGAAAGTCATGGAGATGTGCTACAAGATCTTGGGCGAAGGGAAG
CTTGTCACCCAGCGGGAGTTGTTCTACAACTACTATCGGACTCACCCAAGTACTTCAGC
TGTCAGCGTCATGTCAATCAAATCAAGATGTTGTTTCATTGCTCCGTTGCACAAGG
CAGAGTTTAGGAATCATGGCATCAAGTAGAGGGGCTCTGATTGGACGACTTGTGTTGCAT
GAACCGGAGGAAGAACACATTGATTGTTCCATTCTTGGACCTTCTGGGCATGCCATTACT
GGGATCTGAACCAATTGAGCAGATTAATTTGTCTTCAGATGCCCGTTATCTCATTGTA
GTGGAGAAGGATGCCATATTTAGAGGCTGGCTGAAGACCGCTTATATAATCAGATTCCA
TGTATCCTCATCACTGCAAAAAGGATATCCTGATATCGCCACAAGGTTTATCTTGCATCGA
CTGAGCCAGACTTTTCCAAATATGCCAATATTTGCATTAGTGGACTGGAACCCTGCGGGG
CTCTCTATACTGTGTACTTACAAATATGGAAGCATATCAATGGGCTTGGAATCATAACAGA
TACGCTTGCAATGTAAAATGGCTTGACTAAGAGGAGATGATCTGCAACTTATCCCTCAG
AGTGCATTCCAGGAGTTGAAACCTCGTGATTTGCAGATCGCCAAAAGCTTGCTGTCATCT
AAGTTTCTGCAGGACACGCACAGGGCAGAGTTGACGCGGATGGTCGAGACGGGCACGCGT
GCTGAGATCGAAGCTCTCTACTGCCATGGATTTGATTTCTGGGGAAGTTCATCGCCAGG
AAGATTGTGCAGGGTGACTACATTTGA

Protéine :

MAEAEAEADVPAASLFGADRRRLCSADMLSPPEISRKSTNCSLRSGLLSDVSSVYLSYAF
KRSMLRENDAKAFVRVWKMVMEMCYKILGEGKLVTRQRELFYKLLSDSPKYFSCQRHVNQTI
QDVVSLRLRCTRQSLGIMASSRGALIGRLVLHEPEEEHIDCSILGPSGHAI TGDLNQLSRL
NLSSDARYLIVVEKDAIFQRLAEDRLYNQIPCILITAKGYPDIATRFILHRLSQTFFPNMP
IFALVDWNPAGLSILCTYKYGSISMGLESYRYACNVKWLGLRGDDLQLIPQSAFQELKPR
DLQIAKSLLSKFLQDTHRAELTRMVETGTRAEIEALYCHGFDFLGKFIARKIVQGDYI

Spo11-2-7B :

CDS:

ATGGCGCAGGCGGAGGCGGA~~~~~CGTACCCGCAGCCTCGCTCTTCGGTGCGGACCGC
CGCCTCTGCTCAGCCGACGTGCTCTCGCCGCCGAGGTTTCGGGCAAGGATCGAGGTGGCG
GTGCTCAATTTCTCGCCGCGCTCTCGTCTCCCTCTTCTCCGGCCATCTCTGTCCTCCCC
CTGATCTCACGCAAGTCCACCAATTGCAGCCTGCGCAGCGGCTTGCTGAGCGATGTTTCA
TCGGTTTATCTGTCCTACGCCTTCTGCAAGAGGTCCTAATGAGAGAAAATGATGCCAAG
GCATTCGTCAGAGTATGGAAAGTCATGGAGATGTGCTACAAGATCTTGGGAGACGGGAAG
CTTGTCACCCAGCGGGAGTTGTTCTACAACTACTATCGGACTCACCCAAGTACTTCAGC
TGTCAGCGCCATGTCAATCAAACCATCCAAGATGTTGTTTCATTGCTCCGTTGCACAAGG
CAGAGTTTAGGAATCATGGCATCAAGTAGAGGGGCTCTGATTGGACGACTTATGTTGCAT

GAAGCGGAGGAAGAACACATTGATTGTTCCATTCTTGGACCTTCTGGGCATGCCATTACT
GGGGATCTGAACCAATTGAGCAGATTAATTTGTCTTCAGATGCCCCGTTATCTCATTCTA
GTGGAGAAGGATGCCATATTTTCAGAGGCTGGCTGAAGACCGCTTATATAACCAGCTTCCA
TGTATCCTCATCACTGCAAAAAGGATATCCTGATATCGCCACAAGGTTTATCTTGCATCGA
CTGAGCCAGACTTTTCCAAATATGCCAATATTTGCATTAGTGGACTGGAACCCTGCAGGG
CTCTCTATACTGTGTACTTACAAATATGGAAGCATATCAATGGGCTTGGAAATCATAACAGA
TACGCTTGCAATGTAAAATGGCTTGGACTAAGAGGAGATGATCTGCAACTTATCTCTCAG
AGTGCATTCCAAGAGTTGAAACCTCGTGATTTGCAGATCGCCAAAAGCTTGCTGTCATCT
AAGTTTCTGCAGGACATGCACAGGGCGGAGTTGACTCGGATGGTTCGAGACGGGAACGCGC
GCTGAGATCGAAGCTCTCTACTGCCATGGATTTGATTTCTGGGGAAGTTCATCGCCAGG
AAGATTGTGCAGGGTACTACATTTGA

Protéine :

MAQAEADVPAASLFGADRRRLCSADVLSPEVRARIEVAVLNFLAALSSPSSPAISVLP
SRKSTNCSLRSGLLSDVSSVYLSYAFCKRSLMREDAKAFVRVWKMVMEMCYKILGDGKLV
TQRELFYKLLSDSPKYFSCQRHVNTIQDVVSLLRCTRQSLGIMASSRGALIGRLMLHEA
EEEHIDCSILGPSGHAIITGDLNQLSRLNLSSDARYLILVEKDAIFQRLAEDRLYNQLPCI
LITAKGYPDIATRFILHRLSQTFFNMPIFALVDWNPAGLSILCTYKYGSI SMGLESYRYA
CNVKWLGLRGDDLQLISQSAFQELKPRDLQIAKSLSSKFLQDMHRAELTRMVETGTRAE
IEALYCHGFDFLGKFIARKIVQGDYI

Spo11-2-7D :

CDS:

ATGGCGCAGGCGGAGGCGGA~~~~~CGTACCCGCAACCTCGCTCTTCGGTGCGGACCGC
CGCCTCTGCTCAGCCGACGTGCTCTCGCCCCTCGAGGTTGCGGCAAGGATCGAGGTGGCG
GTGCTCAATTTCTCGCCACGCTCTCGTCTCCCTCTTCTCCGGCCATCCCTGTCTCCCC
CTGATCTCACGCAAGTCCACCAATTGCAGCCTGCGCAGCGGCTTGCTGAGTGATGTTTCA
TCGGTGTATCTGTCCTACGCCTTTTGAAGAGGTCACCTAATGAGAGAAAATGATGCCAAG
GCATTCGTCAGAGTATGGAAAGTCATGGAGATGTGCTACAAGATCTTGGGCGAAGGGAAG
CTTGTACCCAGCGGGAGTTGTTCTACAACTACTATCGGACTCACCCAAGTACTTCAGC
TGTCAGCGCCATGTCAATCAAACCATCCAAGATGTTGTTTCATTGCTCCGTTGCACAAGG
CAGAGTTTAGGAATCATGGCATCAAGTAGAGGGGCTCTGATTGGACGACTTGTGTTGCAT
GAACCGGAGGAAGAACACATTGATTGTTCCATTCTTGGACCTTCTGGGCATGCCATTACT
GGGGATCTGAACCAATTGAGCAGATTAATTTGTCTTCAGATGCCCCGTTATCTCATTCTA
GTGGAGAAGGATGCCATATTTTCAGAGGCTGGCTGAAGACCGCTTATATAATCAGCTTCCA
TGTATCCTGATCACTGCAAAAAGGATATCCTGATATCGCCACGAGGTTTATCTTGCATCGA
CTGAGCCAGACTTTTCCAAATATGCCAATATTTGCATTAGTGGACTGGAACCCTGCAGGG
CTCTCTATACTGTGTACTTACAAATATGGAAGCATATCAATGGGCTTGGAAATCATAACAGA
TACGCTTGCAATGTAAAATGGCTTGGCCTAAGAGGAGATGATCTGCAACTTATCCCTCAG
AGTGCATTCCAAGAGTTGAAACCTCGTGATTTGCAGATCGCCAAAAGCTTGCTGTCATCT
AAGTTTCTACAGGACACGCACAGGGCGGAGTTGACGCGGATGGTGGAGACAGGCACTCGT
GCTGAGATCGAAGCTCTCTACTGCCATGGATTTGATTTCTGGGGAAGTTCATCGCCAGG
AAGATTGTGCAGGGTACTACATTTGA

Protéine :

MAQAEADVPAATSLFGADRRRLCSADVLSPEVRARIEVAVLNFLATLSSPSSPAIPVLP

SRKSTNCSLRSGLLSDVSSVYLSYAFCKRSLMRENDAKAFVRVWKVMMEMCYKILGEGKLV
TQRELFYKLLSDSPKYFSCQRHVNQTIQDVVSLRCTRQSLGIMASSRGALIGRLVLHEP
EEEHIDCSILGPSGHAIITGDLNQLSRLNLSSDARYLILVEKDAIFQRLAEDRLYNQLPCI
LITAKGYPDIATRFILHRLSQTFFNMPIFALVDWNPAGLSILCTYKYGSISMGLESYRYA
CNVKWLGLRGDDLQIPQSAFQELKPRDLQIAKSLLSSKFLQDTHRAELTRMVETGTRAE
IEALYCHGFDFLGKFIARKIVQGDI

Annexe 8 : Séquences des protéines SPO11-1 et SPO11 utilisées pour générer l'arbre phylogénétique.

>Triticum_aestivum_SPO11-1_5AL
MAGSGKRRRATVLDDEERRGRRRLEEAAALLLHKIKGLVGWVVAEVSAGRSPSLALHRYQNYCACA
SAAAAAASLSTCACSYDAPVGTDVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLLQENKHCSKRDIYYM
YPSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNAAFPPIP
VSIEAIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHL
PAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRWLGVFTSDFEYCLPDCCQLQLSSED
RRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI---

>Triticum_aestivum_SPO11-1_5BL
MAGSGKRRRATVLDDEERRGRRRLEEAAALLLHKIKGLVGWVVAEISAGRSPSLALHRYQNYCACA
SAAAAASPSTCACSYDAPVGTDVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLLQENKHCSKRDIYYMY
PSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNTAFPPIPV
SIEAIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHLP
AYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANILRVPEIRWLGVFTSDFEYCLPDCCQLQLSSEDR
RKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI----

>Triticum_aestivum_SPO11-1_5DL
MAGSGKRRRATVLDDEERRGRRRLEEAAALLLHKIKGLVGWVVAEISAGRSPSLALHRYQNYCASA
DAAAAASPSTCACSYDAPVGTDVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLLQENKHCSKRDIYYM
YPSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNAAFPPIP
VSIEAIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHL
PAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRWLGVFTSDFEYCLPDCCQLQLSSED
RRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI---

>Aegilops_tauschii_SPO11-1
MAGSGKRRRATVLDDEERRGRRRLEEAAALLLHKIKGLVGWVVAEISAGRSPSLALHRYQNYCASA
DAAAAASPSTCACSYDAPVGTDVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLLQENKHCSKRDIYYM
YPSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNAAFPPIP
VSIEAIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHL
PAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRWLGVFTSDFEYCLPDCCQLQLSSED
RRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI---

>Triticum_urartu_SPO11-1
MAGSGKRRRATVLDDEERRGRRRLEEAAALLLHKIKGLVGWVGAAGSARTAGRSPSLALHRYQNYC
ACASAAAAASPSTCACSYDAPVGTDVLSLLRKEFHASRLNVLLRVLLVVQQLLQENKHCSKRDI
YYMPSMFVEQAIVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNAAF
PIPVSIKDVVSVAHYILVVEKEAVFQRLANDKFCEKNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQ
LHLPAYCLVSDPYGFDILATYKFGSMQLAYDANVLRVPEIRWLGVFTSDFEYCLPDCCQLQLS
SEDRRKLEGILTRCYLHKEAPEWRLKLEAMLEMVVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQQIRLGRYI

>Brachypodium_distachyon_SPO11-1
MEGREKRRRATVLDDELRGRRREQEAALLLHKIKGLVGWVVAEIVGAGRSPSVALNRYQNYCTS
AAASPPTCACSYDAPVGTDLCLLRKEFHASRLSVLLRVLFVVQQLLQONKHCSKRDIYYMPSI
FIEQAVVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFVEGEKKVYICITNVNAAFSIPVSI

TIKDIVSVAHYILVVEKETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDVPTRRFLRLHVEQLHLPAYC
LVDSDPYGFIDILATYKFGSMQLAYDANLLRVPGIRWLGVFTSDFEYCLPDYCLLDLSSSEDRKKL
EGILTRCYLHREAPEWRRAELEAMLQKGVKFEIEALSASSISFLSQEYIPQKIKLGRHI-----

>Oryza_sativa_japonica_SPO11-1

MAGREKRRRVAALDGEERRRRQEEAATLLHRIRGLVLRWVVAEVAAGRSPTVALHRYQNYCSSASA
AAASPCACSYDVPVGTDLVLSLLHRGSHASRLNVLLRVLLVVQQLLQONKHCSKRDIYYMYPISIFQ
EQAVVDRAINDICVLFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFLEGEKEVYCVTNVNAAFSIPVSI EAI
KDVVSVADYILVVEKETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHLPVYCLV
DADPYGFIDILATYKFGSLQLAYDANFLRVPDIRWLGVFTSDFEDYRLPDCCLLHLSSEDRRKAEG
ILSRCYLHREAPQWRLELEAMLQKGVKFEIEALSACSISFLSEEYIPKKIKQGRHI-----

>Oryza_sativa_indica_SPO11-1

MAGREKRRRVAALDGEERRRRQEEAATLLHRIRGLVLRWVVAEVAAGRSPTVALHRYQNYCSSASA
AAASPCACSYDVPVGTDLVLSLLHRGSHASRLNVLLRVLLVVQQLLQONKHCSKRDIYYMYPISIFQ
EQAVVDRAINDICVLFKCSRHNLNVPVAKGLVMGWIRFLEGEKEVYCVTNVNAAFSIPVSI EAI
KDVVSVADYILVVEKETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHLPVYCLV
DADPYGFIDILATYKFGSLQLAYDANFLRVPDIRWLGVFTSDFEDYRLPDCCLLHLSSEDRRKAEG
ILSRCYLHREAPQWRLELEAMLQKGVKFEIEALSACSISFLSEEYIPKKIKQGRHI-----

>Zea_mais_SPO11-1

MAGRDKRRRAAPLEGDEQQLRRRLEEAAALLLRRIKGLVLRWVVEVAAGRSPSIVLHRACSYDIPV
GTDVLSLLHKDYHTSRLNVLLRVLFVVQQLLQONKHCSKRDIYYMYPISIFVEVAVVDRAINDICI
LFKCSRHNLNVPVVKGLVMGWIRFMEGEKKVYCITSVNAAFSIPVDIEAIKDVVSVAHYILVVE
KETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDIPTRSNWHMMQTCCVSLIYGGLEFSLHILKNIAFQT
AAYFVCHLKIGGKLAFLGAIYTGKQPONGGQSWKQCCKRVSSLRLRHYPQIPFPFYMSTFPRK
SNKACIYKIGHSCIRPGCVIEYNFLSDYSYIRRHIMCKH-----

>Setaria_italica_SPO11-1

MAGRDKRRCAALGCDKQRLRRRQDAAALLLRRIKGLVLRWVVEVAAGRSPSIVLHRYRNYCSAA
DAASPCACSYDAPVGTDLVLSLLHKDCHTSRLNVLLRVLLVVQQLLQONKHCSKRDIYYMYPISI
FVEVAVVDRAINDICILFKCSRHNLNVPVVKGLVMGWIRFVEGEKKVYCITSVNAAFSIPVSI E
AIKDVVSVAHYILVVEKETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRLHVEQLHLPAYC
LVDSDPYGFIDILATYKFGSLQLAYDANLLRVDPDIRWLGVFTSDFEDFCLPDCCLLHLSPEDRRKA
ESILARCYLHKEAPEWRSELEAMLQKGVKFEIEALSASSISFLSDKYIPQKIKQGRHL-----

>Sorghum_bicolor_SPO11-1

MAGRDKRRRAAPLEGDEQQLRRRQEEAALLLRRIKGLVLRWVVEVAAGRSPSIVLHRYRNYCSAA
DSASPCACSYDVPVGTDLVLSLLHNDYHTSRLNVLLRVLLVVQKLLQONKHCSKRDIYYMYPISI
FVEVAVVDRAINDICILLKCSRHNLNVPVVKGLVMGWIRFVEGEKKVYCITNVNAAFSIPVDIE
AIKDVVSVAHYILVVEKETVVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYPDIPTRRFLRYLVEQLHLPAYC
LVDSDPYGFIDILATYKFGSLQLAHDANLLRVDPDIRWLGVFTSDFEYCLPDCCLLHLSPEDRRKA
ERILARCYLHREVPWRSELEAMLQKGVKFEIEALSANSISFLSDEYIPQKIKQGMHL-----

>Brassica_campestris_SPO11-1

MEGNFQISETTNLLRRIKEFTRSIVEDLAEGKSPEISINRFRNYCNDPEADCFCSSEPKGREIL
TLRKRSTYRIDMLLRVLLLVQQLLQENRHGSKRDIYYMHPSAFKAQSVVDRAIADICILFQCSR

YNLNVVSVGNGLVMGWLKFREAGRKFDCLSSLNTAFPVPLVVEEVEDIVSLAEYILVVEKETVFO
RLANDMFCKTNRCIVVTGRGYPDVSTRRFLRLLMEKLQLPVHCLVDCDPYGFEILATYRFGSMQM
AYDIESLRAPEMKWLGAFFPSDSDIYGVPHQCLLPLTEEDKKRTEAMLLRCYLKREMPQWRLELET
MLKRGVKFEIEALS VHSL SFLSEVYI PSKIRSEGSFH-----

>Arabidopsis_thaliana_SPO11-1

MEGKFAISESTNLLQRIKDFTSVVVDLAEGRS PKI SINQFRNYCMNPEADCLCSSDKPKGQEIF
TLKKEPQTYRIDMLLRVLLIVQQLQENRHASKRDIYYMHPSAFKAQSIVDRAIGDICILFQCSR
YNLNVVSVGNGLVMGWLKFREAGRKFDCLNSLNTAYPVPVVEEVEDIVSLAEYILVVEKETVFO
RLANDMFCKTNRCIVITGRGYPDVSTRRFLRLLMEKLHLPVHCLVDCDPYGFEILATYRFGSMQM
AYDIESLRAPDMKWLGAFFPSDSEVYSVPKQCLLPLTEEDKKRTEAMLLRCYLKREMPQWRLELET
MLKRGVKFEIEALS VHSL SFLSEVYI PSKIRREVSSP-----

>Solanum_lycopersicum_SPO11-1

MEGKRSNTRPLTLLRKIKGFTRSIVEDLARGRPPLIYIERFRNYCTDTSGNCSCSSGLSTGKEAI
SLKRECHARRLDVMLRVLLIVQQLQENRHGSKRDIYYMHPTVFKEQSVVDRAINDICILLQCSR
HNLNVVSVGNHGTTPFQSLLKLMAMAVTVTPLMLEQDIISVAQYVIVVEKESVFQRLANDQFCKR
NRCIVITGRGYPDVPTRRFLRLLIDKLHLPVYGLVDCDPYGF DILT TYKFGSLQ MAYDATFLRVS
EIQWLG V FVQDCDNYSI PQQCLLPLTAEDKRKIEAMLPRCYLQREV PQRFELELLLHKGVKFEI
EALS VHSL TFLSHEYLP SKIHNGGYI-----

>Medicago_truncatula_SPO11-1

MEGKRMKLESQKAENAIHLLDKIKEFTRSLLINLTNGNSSIILINRFRNHCTLSDSNCFGSDLP
VGNEVLTLCKETRVHRLGHSLYLLSSMCACSLIILLFKLGFENKHSSKRDIYYMHPSVFLDQS
VVDHAINDICVRMQCSRHNLNVVSAGNGLVMGWIRFVEGKKIFDCINSPNTAHTPVYVEEIKDI
VSMAHYILVVEKESVFRI LANDHFCNANHCIVISGRGYPDIPTRRFLRLLVDNLYIPAYCLVDCD
PYGF DILT TYRFGSMQ MAYDTKHLRVPEIHWLGAFFPSDS DRYFV PKQCLLPLTVEDKRKIKAMLL
RCYLQREVPEWRLELRMMLQKGVKFEIEALS VH T L SFLTESYI PSKI HGKVKI-----

>Populus_trichocarpa_SPO11-1

MERNASSRALLSKIKDLTTSLVKELSEGRSPNICIHKFRNYCTDPNSNCLCSSDLPKGQQVLTLT
RQCHACRIDVLLRVLVIVQKLLQENRHGSKRDIYYMHPSVFSEQSVVDRAINDICILLQCSRHNL
NVVSVGNGLVMGWLQFLEAGRKFDCISSPTTAYTIPVHVEEVKDIVSVANYILIVEKESVFQRLA
NDKFCNANRCIVITGRGYPDIPTRRFLRLLVEKLCLPVYCLVDCDPYGF DILT TYRFGSMQ MAYD
AKILRVPEVQWLGAFFPSDFEKYDLPQQCLLPLTAEDKRRTETMLLRCYLQKEVPEWRLELELMLQ
KGVKFEIEAFSVHTLSFLSEQYI PSKI PKVEVLPGNNIKS-----

>Physcomitrella_patens_subsp._patens_SPO11-1

MEGGTSDSTYLLPQIQMFLHTVLSDIERGGQASVSI PVFKPREYPLETNKKCLTIFEETNTFEEI
SCSSEGGSQRLVAMLVQIVEVLLQQRHATKRVDVYNDTALLKGRLDQSINDICCFHCSRPS
LNLVSSSKGLVTGQLSYEEGR LINC SKRSSTSNGLPVPVHINKVSHLSSSAEYILLVEKETVFO
RLANDKFCANKCCILLTGKGYPDVATRSFLRRLVDQLHLPVYGLMDGDPYGLDILSIYRFGSLTM
AYDAKVLAVPSILWLGIFLSDLGHFGLTENCLLPM SKRDEKKADAILNKSYIQQLAPAWWSKLAE
FRTRRVKLEVEAISTVSFTSLADHYI PSKIRGQCYI-----

>Saccharomyces_cerevisiae_SPO11

MALEGLRKKYKTRQELVKALTPKRRSIHLNSNGHSNGTPCSNADVLAHIKHFLSLAANSLEQHQQ
PISIVFQNKKKKGDTSPPDIHTTLDFFPLNGPHLCTHQFKLKRCAILLNLLKVVMEKLPKNTTV
RDIFYSNVELFQRQANVVQWLDVIRFNFKLSRKLNIIPAQKGLVYSPFPIDIYDNILTCENEP
KMQKQTIFFPGKPLIPFFQDDAVIKLGTTSMCNIVIVEKEAVFTKLVNNYHKLSTNTMLITGKGF
PDFLTRLFLKLEQYCSKLISDCSIFTDADPYGISIALNYTHSNERNAYICTMANYKGITQVL
AQNEVHNKSIQLLSLNQRDYSLAKNLIASLTANSWDIATSPLKNVIEECQREIFFQKKAEMNEI
DARIFEYK-----

>*Drosophila_melanogaster*_SP011

MDEFSENIERIALELLSNLVHGNAATLSVPRNSSGNVISEYRRVSYNNRGSRHSFCVLIYMLSRVH
RLQVRGGSFTVRGLYDNP LLVRSQSRIAEARLDVCRMLRTSPLSLGILAASKGLVAGDLRLMT
NGDVLDS SLYGGPLTLPTDPEKIDRIETLAEFVLIVEKESVFESLLSRNVFGTFERRFILITGKG
YPDCCTRRIVHRLTEENQLAAYILVDADPFGVEIMLVYRHGSKSMSFSQGLTTPALRWIGLHPS
EIPALGTGAVALVAGDNKKINDLLARHDLEPGVRQELRMLQDVQLKAEIESVIDFLTDDYIPNKI
NRNFL-----

>*Caenorhabditis_elegans*_SP011

MYEYSFNPNI DHEPGSVESQQSTIYSDSDSDSFLDDEVI PPKEQAMRKIEFALADIKRQMDNK
EKSLTLRISTSKSHFCLRYTAKRKGKLDRLHCLHQVYDLENDKRSTKRELYEYHKA VYGNQKY
LDSSIKSICELLNESRANLNILSCGRGIIRGAI TFLVENGVIDARVQEV LITDALLFSNIISEA
DFILVVEKDTTFQKLM DENFQAMFPRGILATSKGYPDIATRNV LKMLSEKRKFPIYGLFDADPHG
IEIYLYTYKYGPTKEFAEGRGAFVPTIEWIGLFP TDFHRFTIDQSQC LPLVRTDFVKIEKMI PRSI
QLGEIVVTRELDWMIQNKFKMELESINMCGQ EYMARFLIAPRVM SIEKEIPIQPETIINEYHEDS
QCSLSTDDDREAKDDDYIDSDAE EK FQNMIDNDS-----

>*Homo_sapiens*_SP011

MAFAPMGPEASFFDVLDRHRASLLAALRRGGREPPTGGSR LASSSEVLAS IENIQDIITSLARN
EAPAF TIDNRSSWENIKFEDSVGLQMVSHCTTRKIKSDSPKSAQKFS LILKILSMIYKLVQSNTY
ATKRDIYYTDSQLFGNQTVVDNIINDISCM LKVSRRSLHILSTSKGLIAGNLRYIEEDGTKVNCT
CGATAVAVPSNIQGIRNLVTD AKFVLIVEKDATFQRLLDDNF CNKLSPCIMITGKGVPDLNTRLL
VKKLWDTFHVPVFTLVDADPHGIEIMCIYKYGSM SMSFEAHLTVPAIRWLGLLPSDLKRLNVPK
DSLIP LTKRDQMKLDSILRRPYVTCQPFWRKEMEIMADSKMKAEIQAL TFLSSDYLSRVYLPNKL
KFGGWI-----

>*Mus_musculus*_SP011

MAFAPMGPEASFFDALDRHRASLLAMVKRGAGETPAGATRVASSEVLTAIENIQDI IKSLARN
EVPAF TIDNRSSWENIMFDDSVGLRMI PQCTTRKIRSDSPKSVKKFALILKVLSMIYKLIQS DTY
ATKRDIYYTDSQLFGNQAAVDS AIDDISCMLKVPRRSLHVLSTSKGLIAGNLRYMEEDGTRVQCT
CSATATAVPTNIQGMQH LITDAKFL LIVEKDATFQRLLDDNFCSRMSPCIMVTGKGVPDLNTRLL
VKKLWDTFHIPVFTLVDADPYGIEIMCIYKYGSM SMSFEAHLNLT IPTIRWLGLLPSDIQRLNIPK
DSLIP LTKHDQMKLDSILKRPYITYQPLWKKELEMMADSKMKAEIQAL TLLSSDYLSRVYLPNKL
RFGGWI-----

Annexe 9 : Liste des off-targets pour les 9 cibles TAL+CRISPR après BLAST sur plants.ensembl.org contre le génome du blé tendre.

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Length	Score	E-val	%ID
TAL15						
3B:406459445-406459469	TraesCS3B02G253000	Forward	25	25	7.5E-5	100.0
3D:313313918-313313940	TraesCS3D02G230000	Reverse	23	23	0.0012	100.0
1A:276276453-276276469		Forward	17	17	4.4	100.0
5B:14997709-14997729		Forward	21	17	4.4	95.2
4A:76801741-76801757		Reverse	17	17	4.4	100.0
6A:232247676-232247692		Reverse	17	17	4.4	100.0
TAL28						
3B:644016930-644016954	TraesCS3B02G408400	Reverse	25	25	7.5E-5	100.0
3A:625039504-625039526	TraesCS3A02G376100	Reverse	23	23	0.0012	100.0
3D:481878447-481878471	TraesCS3D02G368600	Reverse	25	21	0.018	96.0
7B:635872129-635872147		Forward	19	19	0.28	100.0
TAL47						
3A:95476772-95476796		Forward	25	25	7.5E-5	100.0
3B:126919919-126919943		Forward	25	25	7.5E-5	100.0
3D:81206330-81206353		Forward	24	24	3.0E-4	100.0
2B:14167770-14167789		Forward	20	20	0.072	100.0
1D:431490228-431490246		Forward	19	19	0.28	100.0
1D:456525328-456525350		Forward	23	19	0.28	95.7
6A:301441801-301441822		Reverse	22	18	1.1	95.5
5B:206766933-206766950		Forward	18	18	1.1	100.0
3D:315887649-315887670		Forward	22	18	1.1	95.5
7A:459999301-459999317		Reverse	17	17	4.4	100.0
7A:574081565-574081581		Reverse	17	17	4.4	100.0
4A:144310633-144310649		Reverse	17	17	4.4	100.0
4A:296065037-296065053		Reverse	17	17	4.4	100.0
4A:703320953-703320969		Forward	17	17	4.4	100.0
3A:706642589-706642605		Forward	17	17	4.4	100.0
3A:742883413-742883429		Reverse	17	17	4.4	100.0
7D:430935144-430935160		Reverse	17	17	4.4	100.0
3B:419797541-419797557	TraesCS3B02G261700	Reverse	17	17	4.4	100.0
3B:532640272-532640288		Forward	17	17	4.4	100.0
7B:682389733-682389749		Reverse	17	17	4.4	100.0
1D:79800952-79800968	TraesCS1D02G094000	Reverse	17	17	4.4	100.0
4B:602693869-602693885		Reverse	17	17	4.4	100.0
1A:3790608-3790624		Forward	17	17	4.4	100.0
5B:436288796-436288812		Forward	17	17	4.4	100.0
1B:514349628-514349644		Reverse	17	17	4.4	100.0
2A:609112345-609112365		Reverse	21	17	4.4	95.2

5D:124343644-124343660		Reverse	17	17	4.4	100.0
5D:124504360-124504376		Reverse	17	17	4.4	100.0
5D:249877921-249877937		Reverse	17	17	4.4	100.0
5D:291916924-291916940		Forward	17	17	4.4	100.0
5D:429575777-429575793		Reverse	17	17	4.4	100.0
5D:442670641-442670657		Reverse	17	17	4.4	100.0
3D:611882596-611882612		Reverse	17	17	4.4	100.0

CRISPR15

3D:313313928-313313947	TraesCS3D02G230000	Forward	20	20	0.024	100.0
3B:406459438-406459457	TraesCS3B02G253000	Reverse	20	20	0.024	100.0
7A:658067879-658067895		Forward	17	17	1.5	100.0
7A:288476528-288476544		Reverse	17	17	1.5	100.0
7D:515901131-515901147		Reverse	17	17	1.5	100.0
3D:385287423-385287439		Forward	17	17	1.5	100.0
2D:231066010-231066026		Forward	17	17	1.5	100.0
2D:366340314-366340330		Reverse	17	17	1.5	100.0
1D:19984146-19984162		Forward	17	17	1.5	100.0
1D:345092176-345092192		Reverse	17	17	1.5	100.0
6D:262767635-262767651		Forward	17	17	1.5	100.0
6B:311693734-311693749		Reverse	16	16	5.9	100.0
1B:505918656-505918671		Forward	16	16	5.9	100.0
3B:87169136-87169151		Forward	16	16	5.9	100.0
5B:459688116-459688131		Forward	16	16	5.9	100.0

CRISPR28

3B:644016946-644016965	TraesCS3B02G408400	Reverse	20	20	0.024	100.0
2B:641895823-641895839		Reverse	17	17	1.5	100.0
2B:632929887-632929903		Forward	17	17	1.5	100.0
3D:592380120-592380136		Reverse	17	17	1.5	100.0
2D:1618384-1618400		Reverse	17	17	1.5	100.0
2D:45142119-45142135		Reverse	17	17	1.5	100.0
4D:178472329-178472345		Reverse	17	17	1.5	100.0
4D:185594498-185594514		Reverse	17	17	1.5	100.0
5D:511561859-511561875		Forward	17	17	1.5	100.0
2A:76928392-76928408		Forward	17	17	1.5	100.0
6D:10079531-10079547		Reverse	17	17	1.5	100.0
5B:626408290-626408306		Reverse	17	17	1.5	100.0
1A:19284583-19284599		Forward	17	17	1.5	100.0
1A:19398721-19398737		Forward	17	17	1.5	100.0
1D:408702050-408702066		Forward	17	17	1.5	100.0
1D:439815251-439815267		Forward	17	17	1.5	100.0
5A:309086650-309086666		Forward	17	17	1.5	100.0
6B:470599892-470599908		Reverse	17	17	1.5	100.0
6B:45849917-45849933		Forward	17	17	1.5	100.0

6B:84080680-84080696		Forward	17	17	1.5	100.0
7B:688670372-688670388		Reverse	17	17	1.5	100.0
7B:725390284-725390300		Reverse	17	17	1.5	100.0
3B:793988669-793988685		Reverse	17	17	1.5	100.0
3B:794059973-794059989		Reverse	17	17	1.5	100.0
3B:452312478-452312494		Forward	17	17	1.5	100.0
3B:766054693-766054709		Forward	17	17	1.5	100.0
3B:766055018-766055034		Forward	17	17	1.5	100.0
7D:74681810-74681826		Reverse	17	17	1.5	100.0
7D:92549532-92549548		Reverse	17	17	1.5	100.0
7D:107609518-107609534		Reverse	17	17	1.5	100.0
7D:43103419-43103435		Forward	17	17	1.5	100.0
3A:267904283-267904299		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:44597977-44597993		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:165260667-165260683		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:201927769-201927785		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:206836168-206836184		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:279214678-279214694		Reverse	17	17	1.5	100.0
Un:44017682-44017698		Forward	17	17	1.5	100.0
Un:44106017-44106033		Forward	17	17	1.5	100.0
Un:172882356-172882372		Forward	17	17	1.5	100.0
Un:201167191-201167207		Forward	17	17	1.5	100.0
4A:689433966-689433982		Forward	17	17	1.5	100.0
3D:481878465-481878480	TraesCS3D02G368600	Reverse	16	16	5.9	100.0
1B:676733533-676733548		Reverse	16	16	5.9	100.0
7B:639750081-639750096		Reverse	16	16	5.9	100.0
3A:302421638-302421653		Forward	16	16	5.9	100.0
Un:10387964-10387979		Forward	16	16	5.9	100.0
Un:201147208-201147223		Forward	16	16	5.9	100.0
4A:319921196-319921211		Reverse	16	16	5.9	100.0
CRISPR47						
3B:126919982-126920001		Reverse	20	20	0.024	100.0
CRISPR01						
3B:659542721-659542740	TraesCS3B02G422500	Reverse	20	20	0.024	100.0
3D:498860549-498860568	TraesCS3D02G383300	Reverse	20	20	0.024	100.0
3A:638926568-638926587	TraesCS3A02G390700	Reverse	20	16	5.9	95.0
CRISPR12						
3B:636455679-636455698	TraesCS3B02G401900	Reverse	20	20	0.024	100.0
6B:34223522-34223538		Reverse	17	17	1.5	100.0
1A:584513814-584513829	TraesCS1A02G433100	Reverse	16	16	5.9	100.0
1D:486883258-486883273	TraesCS1D02G442500	Reverse	16	16	5.9	100.0
1B:678069376-678069391	TraesCS1B02G468900	Reverse	16	16	5.9	100.0
1B:683412918-683412933		Forward	16	16	5.9	100.0

7B:433525081-433525096	TraesCS7B02G231000	Reverse	16	16	5.9	100.0
7B:603336313-603336328		Reverse	16	16	5.9	100.0
7B:749676753-749676768	TraesCS7B02G499700	Reverse	16	16	5.9	100.0
3A:652393984-652393999		Forward	16	16	5.9	100.0
3A:652633718-652633733		Forward	16	16	5.9	100.0
3A:652770228-652770243		Forward	16	16	5.9	100.0
7D:417780007-417780022	TraesCS7D02G327100	Reverse	16	16	5.9	100.0
7A:482742447-482742462	TraesCS7A02G330300	Reverse	16	16	5.9	100.0
3D:477256627-477256642		Reverse	16	16	5.9	100.0
CRISPR14						
3B:659274849-659274868		Forward	20	20	0.024	100.0
3A:638445769-638445787		Forward	19	19	0.095	100.0
3D:498263171-498263189		Forward	19	19	0.095	100.0
2A:568420060-568420075	TraesCS2A02G334700	Reverse	16	16	5.9	100.0

Annexe 10 : Marqueurs testés pour la recherche de SNP.

cible	Marqueurs	type	SNP	cible	Marqueurs	type	SNP	cible	Marqueurs	type	SNP
47-133	cfb27408	SSR	0	15-412	v443_0202_115	ISBP	0	47-133	v443_0295_10	ISBP	0
47-133	cfb12199	SSR	0	15-412	v443_0202_853	ISBP	0	47-133	v443_0295_11	ISBP	0
47-133	cfb27404	SSR	0	15-412	v443_0202_858	ISBP	0	47-133	v443_0295_23	ISBP	0
47-133	cfb27395	SSR	0	15-412	v443_0202_869	ISBP	0	47-133	v443_0295_31	ISBP	0
47-133	cfb27394	SSR	0	15-412	v443_0202_871	ISBP	0	47-133	v443_0295_29	ISBP	0
47-133	cfb27393	SSR	0	15-412	v443_0202_878	ISBP	0	47-133	v443_0295_43	ISBP	0
15-412	v443_0202_9	ISBP	0	15-412	v443_0202_879	ISBP	0	47-133	v443_0295_44	ISBP	0
15-412	v443_0202_11	ISBP	0	15-412	v443_0202_882	ISBP	0	47-133	v443_0295_48	ISBP	0
15-412	v443_0202_18	ISBP	0	15-412	v443_0202_883	ISBP	0	47-133	v443_0295_49	ISBP	0
15-412	v443_0202_19	ISBP	0	15-412	v443_0202_890	ISBP	0	47-133	v443_0295_51	ISBP	0
15-412	v443_0202_23	ISBP	0	15-412	v443_0202_894	ISBP	0	47-133	v443_0295_110	ISBP	0
15-412	v443_0202_27	ISBP	0	15-412	v443_0202_895	ISBP	0	47-133	v443_0295_123	ISBP	0
15-412	v443_0202_28	ISBP	0	15-412	v443_0202_914	ISBP	0	47-133	v443_0295_131	ISBP	0
15-412	v443_0202_32	ISBP	0	15-412	v443_0202_916	ISBP	0	47-133	v443_0295_135	ISBP	0
15-412	v443_0202_34	ISBP	0	15-412	v443_0202_919	ISBP	0	47-133	v443_0295_136	ISBP	0
15-412	v443_0202_36	ISBP	0	15-412	v443_0202_923	ISBP	0	47-133	v443_0295_138	ISBP	0
15-412	v443_0202_37	ISBP	0	15-412	v443_0202_925	ISBP	0	47-133	v443_0295_174	ISBP	0
15-412	v443_0202_38	ISBP	0	15-412	v443_0202_927	ISBP	0	47-133	v443_0295_177	ISBP	0
15-412	v443_0202_43	ISBP	0	15-412	v443_0202_928	ISBP	0	47-133	v443_0295_178	ISBP	0
15-412	v443_0202_45	ISBP	0	15-412	v443_0202_933	ISBP	0	47-133	v443_0295_183	ISBP	0
15-412	v443_0202_54	ISBP	0	15-412	v443_0202_936	ISBP	0	47-133	v443_0295_191	ISBP	0
15-412	v443_0202_55	ISBP	0	15-412	v443_0202_939	ISBP	1	47-133	v443_0295_198	ISBP	0
15-412	v443_0202_58	ISBP	0	15-412	v443_0202_943	ISBP	0	47-133	v443_0295_203	ISBP	0
15-412	v443_0202_59	ISBP	0	15-412	v443_0202_948	ISBP	0	47-133	v443_0295_233	ISBP	0
15-412	v443_0202_63	ISBP	0	15-412	v443_0202_968	ISBP	0	47-133	v443_0295_235	ISBP	0
15-412	v443_0202_64	ISBP	0	15-412	v443_0202_969	ISBP	0	47-133	v443_0295_242	ISBP	0
15-412	v443_0202_67	ISBP	0	15-412	v443_0202_982	ISBP	0	47-133	v443_0295_251	ISBP	0
15-412	v443_0202_68	ISBP	0	15-412	v443_0202_983	ISBP	0	47-133	v443_0295_267	ISBP	0
15-412	v443_0202_74	ISBP	0	15-412	v443_0202_985	ISBP	0	47-133	v443_0295_268	ISBP	0
15-412	v443_0202_76	ISBP	0	15-412	v443_0202_993	ISBP	0	47-133	v443_0295_269	ISBP	0
15-412	v443_0202_78	ISBP	0	15-412	v443_0202_994	ISBP	0	47-133	v443_0295_274	ISBP	0
15-412	v443_0202_88	ISBP	0	15-412	v443_0202_996	ISBP	0	47-133	v443_0295_275	ISBP	0
15-412	v443_0202_100	ISBP	0	15-412	v443_0202_999	ISBP	0	47-133	v443_0295_278	ISBP	0
15-412	v443_0202_102	ISBP	0	47-133	v443_0295_3	ISBP	0	47-133	v443_0295_281	ISBP	0
15-412	v443_0202_105	ISBP	0	47-133	v443_0295_5	ISBP	0	47-133	v443_0295_287	ISBP	0
15-412	v443_0202_106	ISBP	0	47-133	v443_0295_6	ISBP	0	47-133	v443_0295_288	ISBP	0
15-412	v443_0202_110	ISBP	0	47-133	v443_0295_8	ISBP	1	47-133	v443_0295_296	ISBP	0
15-412	v443_0202_112	ISBP	0	47-133	v443_0295_9	ISBP	0				