

## Appel à Projets Attractivité 2021

<b>Acronyme</b>	<b>ACCES</b>	
<b>Titre</b>	Validation et caractérisation de mutations d'un gène impliqué dans la Compatibilité au Croisement entre le blé et le Seigle	
<b>Montant de l'aide</b>	38 760 €	
<b>Coordinateur</b> (Prénom –Nom)	<i>Pierre SOURDILLE</i>	Partenaire et unité : UMR1095 INRAE-UCA GDEC
		Email : pierre.sourdille@inrae.fr
		Tél. : 04 43 76 15 17
<b>Partenaires (*)</b> (Prénom –Nom)	<i>Prénom et nom du scientifique référent</i>	Partenaire et unité :
		Email :
		Tél. :
	<i>Prénom et nom du scientifique référent</i>	Partenaire et unité :
		Email :
		Tél. :

\*Créer autant de lignes que nécessaire

**Préciser le type de projet auquel correspond votre demande :**

- Projet de maturation<sup>1</sup>
- Équipements
- Mise en place de partenariats avec les entreprises

**IMPORTANT : Lors de l'évaluation, une attention particulière sera portée à la rubrique 4 qui vise à expliciter l'amélioration du potentiel de partenariat public-privé permise par le soutien demandé à Plant2Pro et les résultats qui en seront issus.**

**Résumé non confidentiel (20 lignes maximum)**

La réalisation de croisements entre le blé et des espèces apparentées reste aléatoire en particulier lorsqu'on s'adresse au pool tertiaire plus éloigné. Ces hybridations sont pourtant à la base de création d'espèces telles que le Triticale issu du croisement entre le blé et le seigle ou le Tritordeum dérivé du croisement entre le blé et l'orge. Ces espèces connaissent un regain d'intérêt dans la mesure où elles peuvent être cultivées dans des milieux plus hostiles ou plus pauvres ou avec des apports en intrants (engrais, pesticides, eau) plus réduits. Par ailleurs, les croisements avec des espèces apparentées permettent d'enrichir la diversité génétique des blés par l'introduction d'allèles originaux (introgressions) conférant des résistances à des stress biotiques ou abiotiques. Cependant, la majorité des variétés élites actuelles de blé ne peuvent être croisées avec des espèces voisines ce qui réduit la base génétique susceptible d'être exploitée pour l'introgression d'allèles nouveaux dans les programmes de sélection et l'amélioration de la diversité des Triticales et des Tritordeums. L'inhibition de l'hybridation entre le blé et des espèces telles que le seigle ou l'orge est sous contrôle génétique simple et seuls quelques locus affectent la compatibilité entre ces espèces. Le locus majeur (*SKr*) qui contrôle à lui seul environ 25% de la variabilité du caractère, a été identifié dans la partie distale du bras court du chromosome 5B (5BS). Une démarche de clonage positionnel du gène impliqué a été engagée et a abouti au développement d'une collection de mutants (CRISPR, EMS, naturels) pour les gènes candidats du locus qu'il convient de caractériser pour valider définitivement le gène responsable de l'incompatibilité. L'objectif du projet ACCES est donc de séquencer les différents gènes candidats sur cette collection de mutants pour identifier les mutations les plus pertinentes et d'initier parallèlement une approche d'extinction du gène *SKr* par la technologie VIGS (Virus Induced Gene Silencing) qui permettrait de travailler sur n'importe quelle variété de blé pour la croiser avec les espèces apparentées et ainsi enrichir la diversité pour la sélection.

<sup>1</sup> Les projets de maturation doivent permettre d'améliorer significativement le transfert de connaissances (gain de maturité Technology Readiness Level (TRL)).

### **1- Objectifs de la demande (1/2 page)**

Le projet ACCES a deux objectifs : (1) valider et caractériser plus finement les mutations d'un gène impliqué dans la compatibilité au croisement entre le blé et le seigle (SKr) et (2) d'initier une approche d'extinction de ce gène par la technologie VIGS (Virus-Induced Gene Silencing). En ce qui concerne le premier objectif, ACCES repose sur la validation moléculaire (étude des différentes mutations par séquençage) de mutants induits (CRISPR/Cas9 et EMS produits par ailleurs) ou naturels (collection de lignées compatibles et incompatibles) pour six gènes localisés dans l'intervalle portant le locus SKr. En ce qui concerne les mutants CRISPR/Cas9, il convient de vérifier la présence ou l'absence de mutation au niveau des cibles de même que le type de mutation obtenu (délétion/insertion, mutation). Pour les mutants EMS ou naturels, l'objectif est de caractériser des mutations actuellement inconnues. En ce qui concerne le deuxième objectif, ACCES permettra à termes d'éteindre la fonction du gène SKr pour élargir la diversité des blés compatibles au croisement avec le seigle.

L'objectif de la demande relative au projet ACCES est donc : (1) d'apporter un soutien permettant le séquençage des gènes candidats des différents mutants ainsi que leur analyse au regard des séquences de référence des deux variétés compatibles et incompatibles ; (2) de contribuer à la mise au point et à l'exploitation d'une approche VIGS permettant d'établir un niveau raisonnable de compatibilité au croisement avec le seigle chez des variétés de blé élites pour améliorer la diversité chez le Triticale et potentiellement chez le blé par la facilitation des croisements autorisant ensuite l'introggression de fragments d'ADN issus d'espèces apparentées par recombinaison homéologue. Atteindre ces deux objectifs permettrait de proposer une stratégie innovante aux sélectionneurs privés pour améliorer ces deux espèces.

### **2- S'il s'agit d'un projet de maturation, expliquer les antécédents, le plan d'action du projet et les étapes pour obtenir un gain de maturité TRL (1 page)**

**Antécédents** : Le projet ACCES s'inscrit dans la continuité et la complémentarité du projet VACCIN (2018-2020) soutenu par INRAE-Transfert dans le cadre des actions de pré-maturation. L'objectif du projet VACCIN était d'identifier le gène majeur (SKr) responsable de la compatibilité au croisement entre le blé et le seigle. La démarche globale reposait sur l'inactivation des six gènes du locus par la technologie CRISPR/Cas9 chez une lignée incompatible transformable (Courtot) afin d'observer l'apparition d'un phénotype compatible. Cette information devrait nous permettre de proposer aux semenciers travaillant sur céréales à pailles – principalement sur Triticale et blé mais aussi sur orge car le contrôle des croisements entre les orges cultivées (*Hordeum vulgare*) et les orges sauvages *H. bulbosum* est sous la dépendance du même gène – une approche pour augmenter le nombre de variétés de blé ou d'orge élites compatibles et donc la possibilité de créer des blés ou des orges avec des introgressions originales ou des Triticales ou des Tritordeums plus diversifiés. Initialement, le phénotypage (croisement par seigle) des plantes transgéniques de première génération (T0) devait se faire au printemps 2020 afin de trier les génotypes les plus compatibles pour une analyse plus détaillée des mutations (séquençage) et un deuxième génotypage de confirmation sur les descendants en 2021 (Thèse de Julie Laugerotte ; financement INRAE/Clermont-Auvergne-Métropole). Cependant, la crise sanitaire nous a contraint à décaler les croisements et à ne les faire que sur les descendants ce qui a conduit à une multiplication des essais. L'acquisition des données phénotypiques (compatibilité) sur une collection de mutants est en cours.

**Plan d'action** : Pour caractériser les différentes mutations chez les mutants CRISPR/Cas9, EMS ou naturels, chacun des six gènes sera amplifié à l'aide d'amorces spécifiques de la copie d'intérêt chez ce génome polyploïde (copie 5B). L'amplification sera menée sur l'entièreté des gènes pour les mutants EMS ou naturels (mutation inconnue). Pour les mutants issus des expérimentations CRISPR/Cas9, des amorces encadrant la zone cible des guides ont été définies et le séquençage sera cantonné à ces seules régions. Les séquences seront nettoyées puis analysées comparativement à la séquence de référence des lignées compatibles (Chinese Spring) ou incompatibles (Courtot ; les deux séquences sont disponibles dans le laboratoire d'accueil). La présence de mutations sera corrélée à une analyse phénotypique (compatibilité avec le seigle) réalisée par ailleurs (projet VACCIN ; voir ci-dessus).

Parallèlement à ce travail, une approche d'extinction sera menée pour chacun des six gènes par la technologie VIGS. Des constructions appropriées (fragments codant entre 250 et 400 pb) seront élaborées pour chacun des six gènes et introduites dans le virus de la mosaïque de l'orge (Barley stripe mosaic virus ; BSMV). Des jeunes plants de tabac seront infectés afin de multiplier les particules virales. Après isolement, celles-ci seront utilisées en conditions contrôlées (chambre P3) pour infecter des plantes de blé (variété incompatible Courtot) environ deux semaines avant floraison de façon à provoquer l'extinction du gène candidat juste au moment des

croisements. Les plantes infectées pourront alors être croisées par seigle afin d'observer l'apparition d'un niveau significatif de compatibilité (>20% alors que Courtot présente normalement une compatibilité <5%). Dans le même temps, la baisse du niveau d'expression de chacun des six gènes sera évaluée par RT-qPCR à l'aide des amorces spécifiques développées et utilisées pour le séquençage.

**Etapes pour obtenir un gain de maturité TRL** : Actuellement, nous disposons d'une collection de mutants induits ou naturels pour les six gènes du locus *SKr* sans qu'il soit possible de trancher en faveur de l'un ou l'autre pour expliquer le phénotype de compatibilité. Le niveau de maturité TRL est donc assez bas. L'obtention des séquences et donc la caractérisation des mutations permettrait de franchir une étape significative en apportant des éléments tangibles pour une édition du meilleur candidat ou la recherche des mutants pertinents dans la diversité naturelle. Par ailleurs, le développement de l'approche VIGS pour son extinction entraînerait un saut additionnel en TRL, en fournissant un outil supplémentaire pour les sélectionneurs désireux d'enrichir la diversité des blés compatibles pour l'amélioration du Triticale.

### **3- Montant demandé, objet de la dépense (en précisant fonctionnement, équipements ou salaires) et justification**

Merci de renseigner l'annexe financière associée à ce formulaire, avec le planning et l'échéancier financier si un recrutement est prévu, et de décrire ici le détail des dépenses correspondantes.

Dans le cas où ce projet s'inscrit dans une démarche plus globale, complémentaire à d'autres projets, il convient de décrire succinctement ces projets, les ressources qu'ils apportent et la plus-value attendue du soutien par Plant2Pro®.

Ce projet s'inscrit dans la continuité et en complément du projet de pré-maturation VACCIN soutenu par INRAE-Transfert (40 000 €). Ce projet avait pour objectif de développer des mutants CRISPR/Cas9 pour les six gènes du locus *SKr* afin d'identifier le gène responsable du phénotype de compatibilité. Actuellement, 143 mutants CRISPR/Cas9 ont été produits et le phénotypage est en cours. Par ailleurs une collection de 48 mutants, soit EMS (16 Cadenza et 8 Kronos), soit naturels (24 variétés compatibles) a été constituée mais les mutations à l'origine de la compatibilité ne sont pas connues. Le projet ACCES apporterait une plus-value essentielle au projet VACCIN dans la mesure où il fournirait une connaissance des mutations induisant la compatibilité ce qui pourrait ouvrir les portes d'une édition du gène *SKr*. Par ailleurs, il permettrait également de développer une approche innovante d'extinction du gène par VIGS ce qui élargirait les sources de diversité des blés pour la création de Triticales primaires.

En plus du projet VACCIN qui apporte un soutien financier, l'implication des agents permanents ou temporaires de l'équipe GeCO sur ce projet représente plus d'un équivalent temps plein (ETP) avec la participation d'une doctorante (1 ETP ; bourse INRAE/Clermont-Auvergne-Métropole), d'une stagiaire de DUT (2 mois en 2021 pour les analyses moléculaires) et de deux techniciens qui interviennent pour les semis et repiquage, la réalisation des croisements blé/seigle et le suivi sanitaire et l'arrosage des plantes dans les chambres et les serres.

#### **Moyens sollicités auprès de Plant2Pro :**

Moyen humain : une bourse Master II (7 mois) pour la réalisation des analyses des séquences : 4 060 € ;

Chambre de culture P3 : une cellule complète en chambre de culture transgénique : 6 600 €

Séquençage : séquençage des six gènes mutés candidat (100 €/séquence) sur collection (48 individus) + séquençage des zones cibles mutants CRISPR/Cas9 (20 €/séquence ; 143 mutants) : 7 660 € ;

Réalisation de constructions : synthèse des constructions VIGS : 500 €/construction, 7 constructions (6 gènes + contrôle) soit 3 500 € ;

Frais de laboratoire : petit consommable (pointes, gants, tubes...), enzymes, tampons, etc. estimé à 10 000 €/an ;

Frais de fonctionnement de l'Unité (25% du montant du projet hors salaire) : 6 940 €

Total projet ACCES : 38 760 €

### **4- Intérêt pour Plant2Pro® (max 1 page)**

L'argumentaire proposé sous cet item est déterminant pour la sélection des projets. Il convient d'y accorder le plus grand soin. Pour un projet de maturation : expliquer en quoi la démarche proposée permet une montée en TRL de résultats, de livrables issus de votre entité. Expliquer en quoi le projet permet d'améliorer le potentiel de développement de ces résultats et livrables et contribue à améliorer l'attractivité de votre entité pour le développement de partenariats public-privé. Dans tous les cas, il convient d'indiquer les

**partenaires industriels potentiellement intéressés par les sorties du projet s'il était soutenu.**

Pour la prochaine décennie, le département Biologie et Amélioration des Plantes (BAP) d'INRAE affiche la volonté d'améliorer les espèces d'intérêt agronomique dans un souci de performance environnementale (en particulier en limitant les intrants engrais, pesticides, eau), avec la contrainte du réchauffement climatique afin de traiter les questions relatives à l'alimentation (quantité et qualité) tout en tenant compte des besoins non-alimentaires croissants (biocarburants). Le projet ACCES s'inscrit clairement dans cette stratégie dans la mesure où son objectif est de valider et caractériser un gène impliqué dans la compatibilité aux croisements interspécifiques ce qui permettra d'améliorer l'utilisation de ressources exotiques voire sauvages comme source d'allèles originaux et performants aux locus d'intérêt agronomique pour accroître la diversité disponible chez le blé et le triticale.

En termes de niveau de maturité technologique (TRL), celui-ci est actuellement très bas car nous n'avons toujours pas fait la démonstration que la mutation d'au moins l'un des gènes du locus confère la compatibilité au croisement entre le blé et le seigle. L'Unité GDEC travaille sur ce sujet depuis une vingtaine d'années. Elle a développé des outils (populations hautement recombinantes, cartes génétiques haute densité, cartes physiques chez des lignées compatibles et incompatibles, etc.) qui lui permettent de disposer d'un nombre restreint de gènes candidats (six) pour *SKr*. Cependant, il manque la validation fonctionnelle et la caractérisation précise du gène pour finaliser ce projet. ACCES permettra donc de valider définitivement le meilleur candidat et d'offrir aux sélectionneurs un outil supplémentaire d'amélioration de la diversité des blés et triticales. Cela permettra de monter significativement sur l'échelle TRL en fournissant un candidat solide pour la recherche de mutants naturels ou le développement de mutants édités ou par extinction d'expression. L'intérêt des acteurs de la filière blé et triticale pour un meilleur contrôle des croisements entre ces deux espèces se manifeste par un partenariat déjà établi avec certaines sociétés de sélection du triticale (voir le GIE Triticale : <http://www.gie-triticales.fr/>) pour développer des lignées élites avec une meilleure compatibilité aux croisements blé/seigle et ainsi produire plus rapidement des lignées améliorées chez les céréales à paille.

Au niveau local, le Challenge 1 de l'I-SITE CAP 20-25 comporte un volet visant à optimiser l'intégration des systèmes culturaux dans leur environnement ce qui implique pour les céréales, une amélioration de la résilience des variétés inscrites face aux aléas climatiques et de leur durabilité vis-à-vis de la rapidité d'apparition de nouvelles souches pathogènes. L'objectif est que le gain génétique chez les nouveaux idéotypes surpasse l'effet des aléas climatiques annuels. De ce point de vue, le projet ACCES est parfaitement connecté à cet enjeu et s'inscrit clairement dans le livrable « Les nouveaux idéotypes de céréales : construire des idéotypes de céréales résilients aux changements globaux ». Il intervient en amont de la création d'idéotypes en proposant de comprendre les mécanismes qui contrôlent les croisements entre espèces apparentées pour introduire une variabilité nouvelle, originale et adaptée aux programmes de sélection actuelle et locaux chez deux espèces de céréales majeures, le blé et le triticale.

En termes de résultats, nous escomptons pouvoir définitivement valider le gène impliqué dans la compatibilité entre le blé et le seigle. D'un point de vue scientifique, cette validation apportera des connaissances supplémentaires et originales sur les mécanismes de contrôle des barrières inter-espèces. D'un aspect économique, nous devrions contribuer significativement au développement de nouvelles variétés plus compatibles et donc améliorer notre capacité à développer des variétés originales avec des allèles dérivés d'espèces apparentées permettant ainsi un enrichissement de la diversité. Ceci devrait conduire à ouvrir de nouveaux marchés pour les sociétés de sélection travaillant sur blé et triticale ce qui devrait aboutir au développement des activités de pre-breeding pour améliorer la diversité.

En terme de stratégie de valorisation, outre des publications de bon niveau dans la littérature scientifique, nous souhaitons que ces nouvelles méthodologies d'introduction de diversité à partir d'espèces apparentées soient mises à disposition de tous les acteurs de la filière qui pourront les utiliser en routine dans leurs programmes de sélection.