MISE EN PLACE D'ALLÈLES FONCTIONNELS DE RÉSISTANCE AUX VIRUS À PARTIR DES FACTEURS DE SENSIBILITÉ EIF4E PAR ÉDITION DU GÉNOME CHEZ LA TOMATE

Thèse de Kyoka **KUROIWA**[1]

Analysée par Thierry **CANDRESSE**[2]

Directeurs de thèse :

Jean-Luc **GALLOIS**, Directeur de recherche INRAE, UR GAFL, INRAE Avignon

Marianne **MAZIER**, Ingénieure de recherche INRAE, UR GAFL, INRAE Avignon

Les travaux de cette thèse avaient pour objectif d'évaluer la faisabilité de différentes approches d'édition du génome chez la tomate pour générer des allèles des gènes codant pour les facteurs d'élongations de la traduction eIF4E1 et eIF4E2, afin de conférer à la plante une résistance aux potyvirus par perte de sensibilité. Depuis une vingtaine d'années, on sait en effet, que des facteurs d'initiation de la plante hôte, dont eIF4E, sont recrutés par les potyvirus lors de l'infection virale et que certains allèles de ces gènes, non recrutables par les virus, conduisent à une résistance de la plante. Cependant la variabilité naturelle souvent réduite d'eIF4E chez de nombreuses plantes ne permet pas toujours de disposer de sources de résistances basées sur ce gène. Il est alors tentant de vouloir étendre cette variabilité naturelle par des approches de mutagenèse, ciblée ou non, afin de créer de nouveaux gènes de résistance, ce qui est abordé dans la thèse par des approches d'édition du génome.

Après une très large introduction bibliographique, le manuscrit de thèse présente en quatre chapitres les résultats obtenus. Ces chapitres sont conçus comme des manuscrits d'articles scientifiques, les deux premiers correspondant à des articles déjà publiés respectivement dans Plant Science et dans Plant Biotechnology Journal, les deux derniers à des manuscrits d'articles encore en préparation.

Dans le chapitre I, une approche CRISPR/Cas9 a été utilisée pour inactiver le gène eIF4E2 chez la variété de tomate cerise West Virginia 106 (WVa106). L'analyse des plantes obtenues montre que l'inactivation de ce gène récapitule le phénotype de résistance déjà observé chez

[1] Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université d'Aix-Marseille, en biologie végétale, préparée au sein de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé à l'Unité de recherche INRAE Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), Avignon, présentée et soutenue le 13/9/2024.

[2] Membre de l'Académie d'agriculture de France, section 1, « Productions végétales ».

Copyright Académie d'agriculture de France, 2025.

des mutants EMS d'une autre variété, avec une résistance complète ou partielle, selon l'isolat de pepper veinal mottle virus (PVMV) considéré, et une sensibilité à un autre potyvirus, le potato virus Y (PVY). Ces résultats montrent la très bonne faisabilité de création de résistance basés sur eIF4E2 par édition du génome chez la tomate, mais confirment des données précédentes sur les limites d'une telle approche, la redondance des gènes eIF4E conduisant à des résistances à spectre étroit et le plus souvent instables.

C'est logiquement vers des approches d'édition plus sophistiquées, et visant à reproduire des allèles naturels conférant des résistances à plus large spectre, que se tournent ensuite les efforts. Dans le chapitre II, ainsi que dans les deux qui suivent, une série de mutants ponctuels, obtenus antérieurement par l'équipe par édition de bases, est caractérisée en détail. Les mutations introduites concernent deux régions de eIF4E1 situés à proximité de la poche de fixation du substrat et connues pour contribuer à la résistance aux potyvirus. Les résultats obtenus montrent qu'une mutation dans la seule région I n'apporte pas de phénotype de résistance et que des mutations dans la seule région II n'apportent que des résistances à spectre étroit. En revanche, l'introduction simultanée de mutations dans ces deux régions confère une résistance à spectre plus large (PVY et PVMV) sans aller cependant jusqu'au spectre très large conféré par le gène naturel *pot1* qui s'étend à une résistance au tobacco etch virus (TEV).

Dans le chapitre III, la durabilité des résistances ainsi introduites est évaluée ainsi que leur impact sur le phénotype des plantes. Les résultats obtenus montrent la fonctionnalité des allèles eIF4E et leur absence d'impact sur le développement végétatif et reproductif des tomates ainsi éditées. Ils montrent également que les résistances obtenues sont moins durables, lorsqu'elles sont confrontées à l'isolat N605 du PVY, que la résistance naturelle conférée par *pot1*. Cette faible durabilité est liée à l'accumulation de variants viraux possédant des mutations dans leur protéine VPg, la plupart des mutations observées ayant déjà été associées dans des travaux antérieurs au contournement de résistances basées sur eIF4E.

Enfin le chapitre IV s'intéresse à l'impact phénotypique de mutations dans le gène ALS codant pour l'acetolactate synthase. En effet, l'introduction de mutations dans ce gène permet d'améliorer l'efficacité des approches d'édition du génome, en réalisant un co-editing touchant à la fois le gène d'intérêt et le gène ALS afin de conférer une résistance dominante aux herbicides inhibiteurs de l'ALS. Cette approche permet ainsi une sélection simple des plantes co-éditées et avait été mise en œuvre par l'équipe. Les résultats obtenus montrent que certaines des mutations créées dans le gène ALS peuvent avoir un effet phénotypique délétère, avec une réduction de la croissance végétative reliée à des modifications métaboliques. Ces résultats, sans doute encore un peu préliminaires, avertissent sur une limite de la co-édition du gène ALS, et ont clairement une portée qui dépasse le cadre de l'étude du pathosystème tomate/potyvirus.

Pris dans leur ensemble, les résultats de cette thèse démontrent la faisabilité d'approches d'édition du génome pour développer de nouvelles résistances aux potyvirus et font nettement progresser nos connaissances sur la contribution individuelle de mutations dans les régions I et II de cet important facteur de sensibilité. Ils démontrent également la complexité du travail à réaliser pour recréer par cette voie des résistances durables et à large spectre. Il s'agit clairement d'un travail sur un front de recherche et qui ouvre de nouvelles perspectives

Copyright Académie d'agriculture de France, 2025.

importantes pour la création de nouvelles résistances, y compris lorsque de telles résistances ne sont pas présentes dans la variabilité naturelle d'une espèce végétale.

Cette thèse a fait l'objet d'une bonne valorisation puisque les deux premiers chapitres ont été publiés sous forme d'articles dans de bonnes revues internationales du domaine. Les résultats, parfois encore un peu préliminaires des chapitres III et IV, ne semblent pas encore avoir fait l'objet de publications.

Les résultats originaux de cette thèse s'inscrivent pleinement dans le champ d'intérêt de l'Académie d'agriculture de France et justifient la valorisation de cette analyse par sa présentation sur le Site et dans le Mensuel de l'Académie.

Copyright Académie d'agriculture de France, 2025.