

## RÉSISTANCE AU PVY ET NOUVELLES TECHNOLOGIES

# COMMENT PIMENTER LA RECHERCHE ?

Des outils biotechnologiques tels que le système Crispr-Cas9 peuvent-ils nous aider à reproduire chez la pomme de terre une forme de résistance observée chez le piment et qui empêche la multiplication des particules virales dans les cellules de la plante ? Telle est la question que se sont posée les chercheurs d'Inrae et de la FN3PT.

**P**our aller vers une agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement, la recherche doit avancer dans la compréhension des mécanismes et interactions complexes entre la plante et les parasites.

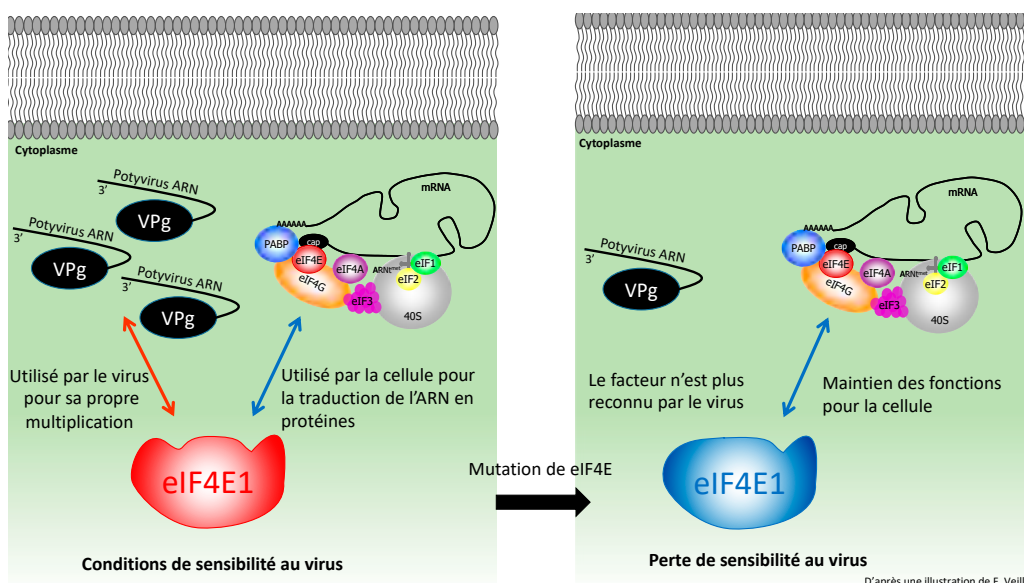
Chez les végétaux, les méthodes permettant de lutter contre les virus sont limitées. Les plus efficaces reposent sur la prévention, comme la sélection sanitaire et l'amélioration génétique par la création de variétés résistantes. Des systèmes de lutte biologique et phytosanitaire sont déployés. Ne pouvant pas atteindre le virus, ils s'attaquent indirectement aux vecteurs qui le transmettent à la plante, qu'il s'agisse d'insectes comme les pucerons ou de nématodes du sol.

### RÉSISTANCE ET PERTE DE SENSIBILITÉ

Dans les années 2000, les résultats de recherches désignant l'implication d'un facteur de traduction eIF4E (eukaryotic Initiation Factor) de la cellule végétale dans la résistance aux Potyvirus avaient été accueillis avec un grand intérêt par la communauté scientifique. Les virologues et les améliorateurs des plantes y ont notamment vu des possibilités de développement particulièrement intéressantes pour la lutte génétique contre les maladies virales (**voir encadré page suivante**). Cette résistance a été identifiée et décrite chez le piment et chez des espèces botaniques qui lui sont proches. La comparaison des séquences génétiques du facteur eIF4E entre les individus résistants et les sensibles aux virus a révélé la présence de plusieurs mutations conduisant chacune à la résistance sans affecter le fonctionnement du facteur eIF4E pour la plante. Les chercheurs ont démontré que, combinées, ces mutations conduisent à une résistance durable, car cette multiplicité rend plus difficile l'apparition de variants viraux capables de contourner la résistance (**Figure 1**). Pour des raisons génétiques, la plante ne sera résistante que lorsque tous les allèles présents dans le génome présenteront la (ou les) mutation(s) favorable(s).

L'acquisition de la résistance au PVY chez le piment est-elle reproductible chez la pomme de terre ?

**Figure 1** Sensibilité au virus et principe de mutation de eIF4E

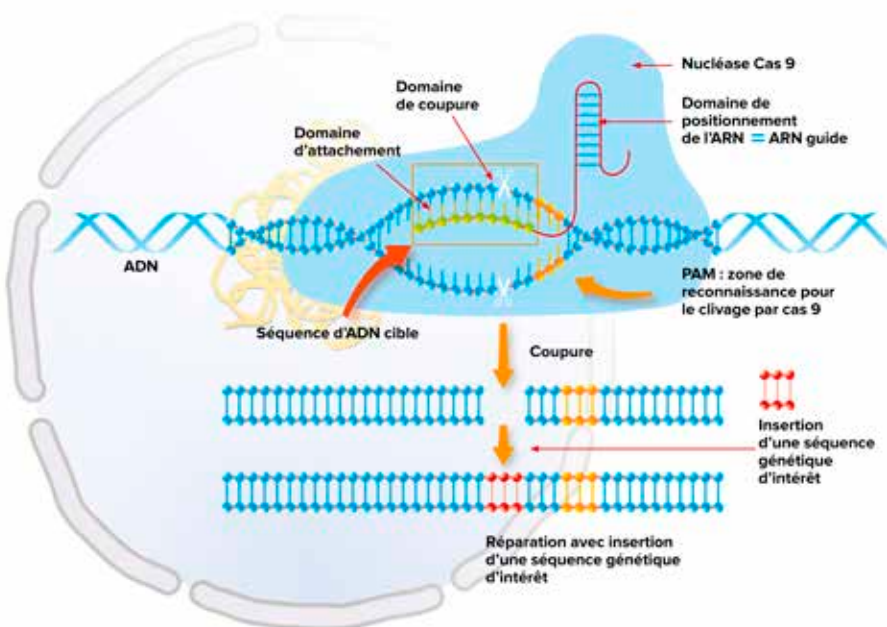


Des modifications de quelques acides aminés dans le facteur de traduction eIF4E sont à l'origine de la perte de sensibilité de la plante au virus.

## UN PROJET DE RECHERCHE

Le projet PotatoCrisp (financé par Plant2Pro, 2017-2019) a cherché à répondre à la question de la possibilité de reproduire chez la pomme de terre les mutations identifiées comme efficaces chez le piment pour l'acquisition de la résistance au PVY. À la différence du piment qui est diploïde, la pomme de terre est une plante tétraploïde, ce qui veut dire qu'elle comporte quatre allèles pour chaque gène, ces quatre allèles devant muter pour que le caractère favorable s'exprime. Si des mutations ont pu se produire de manière spontanée chez le piment sur les deux allèles du facteur *eIF4E*, qu'elles se soient produites naturellement sur les quatre allèles chez la pomme de terre est très improbable. Pour cette raison des outils de *gene* et *base editing* – tels que le système *Crispr-Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Crispr associated*) permettant de provoquer des mutations dirigées sur certaines séquences ADN – paraissent particulièrement adaptés à la pomme de terre, afin de provoquer des mutations du même type sur tous les allèles présents au locus *eIF4E*. Emprunté au monde microbien, le complexe *Crispr-Cas9* est en effet connu pour sa capacité à induire des mutations aléatoires ou des substitutions précises de nucléotides dirigées qui interviennent là où

Figure 2 Retouche génomique par le système *Crispr-Cas9*



Interaction entre le complexe *Crispr-Cas9* et l'ADN dans les cellules de la plante. La nucléase qui coupe l'ADN, une fois reconnue la séquence cible, est à l'origine des mutations.

Semae

le complexe se fixe. Il est constitué d'une nucléase, enzyme qui coupe l'ADN, là où l'ARN guide qui lui est associé reconnaît la séquence cible complémentaire (Figure 2). Pour parvenir à ces objectifs ambitieux, reproduire des mutations précises sur les quatre allèles de *eIF4E* tout en conservant la fonctionnalité du gène pour la pomme de terre,

l'expertise et les connaissances de plusieurs équipes ont été réunies dans différents domaines :

- des outils de *base editing* et la mise au point de techniques d'édition sur des variétés de pomme de terre (Inrae-IJPB, Igepp)\*;
- la caractérisation moléculaire et sérologique des variétés de pomme de terre vis-à-vis du PVY (FN3PT);

Pour toutes insertions publicitaires

Contacteur : Sylvie Bendelé  
Tél. : +33 (0)1 40 22 70 75  
+33 (0)7 63 23 05 56

s.bendele@gfa.fr

**MANUPAL PALOX**

Le spécialiste belge du palox à pommes de terre

Palox de 1,2 à 2 tonnes



www.palox.be - paletterie@v3-manupal.be  
rue du Parc Industriel, 33 5590 Achêne Belgique +32 (0)83.23.17.87



En Europe, Crispr reste confinée aux laboratoires et serres sous agrément, mais une vive attention est portée à ces nouvelles techniques afin d'évaluer risques et avantages de leur application."

- des mutations efficaces de eIF4E et leur combinaison pour une perte de sensibilité durable (Inrae-UGAFL)\*.

### UNE PREMIÈRE APPROCHE

Dans le panel des pommes de terre cultivées, des variétés ont été choisies selon trois critères : leur sensibilité au PVY, leur sensibilité à l'expression de nécroses sur tubercule et leur capacité de répondre aux techniques de culture *in vitro*. En effet, certaines étapes du processus d'édition avec le complexe Crispr-Cas9 nécessitent une régénération à partir de tissus ou de cellules végétales.

Plus de 400 plantes ont été obtenues par ces techniques de mutation dirigée. Elles ont été analysées et cinq d'entre elles, porteuses d'une quadruple mutation, ont été sélectionnées pour le test d'inoculation en serre avec différents isolats de PVY. Deux génotypes porteurs de mutations intéressantes aux quatre allèles n'ont pas pu être testés car ils sont restés de toute petite taille, laissant supposer chez eux une altération du fonctionnement du gène eIF4E au niveau des cellules de la plante. Les trois autres plantes mutées pour le

gène et inoculées n'ont pas révélé de résistance aux isolats testés du PVY.

Si cette première approche n'a pas encore conduit aux résultats espérés, elle a cependant permis de poser les premières pierres vers l'étude chez

Préparation des plantes eIF4E-mutées pour le test en serre. Des différences dans leur développement sont déjà visibles.



Laura Chauvin

## → VIRUS Y

### DES DOMMAGES CONSIDÉRABLES



Sur des plantes de pomme de terre virosées par le PVY, les symptômes sont visibles sur les feuilles et des nécroses apparaissent sur tubercule. Ces dommages conduisent à des pertes significatives à la récolte en nombre et qualité des tubercules.



Laurent Glais

Le groupe des Potyvirus compte des virus qui causent des dégâts considérables. C'est le cas du virus Y (*Potato virus Y*, PVY), un virus à large spectre d'hôtes qui cause chez la pomme de terre des dommages qui vont de la mosaïque foliaire aux nécroses du tubercule. C'est la qualité sanitaire du plant mais aussi le rendement de la culture et la qualité commerciale du produit qui sont fortement affectés. Le piment, comme la tomate ou le tabac, sont attaqués par ce même virus.

Les virus se caractérisent par leur petit génome qui code pour des protéines. Ils ont besoin d'un hôte pour se multiplier. Le PVY est constitué d'une coque protéique, la capsid qui renferme son matériel génétique, un simple brin d'ARN. Pour accomplir son cycle dans la cellule hôte, il détourne des composantes de la machinerie cellulaire, comme le facteur de traduction eIF4E. Ce facteur est indispensable à la vie de la plante : il participe à la traduction de l'information génétique en permettant de passer de l'ARN aux protéines.

la pomme de terre de la variabilité du gène eIF4E. L'obtention de mutants où la fonctionnalité du facteur de traduction eIF4E reste intacte pour la plante est une opération délicate. La polyploïdie de la pomme de terre ne facilite pas la tâche. La connaissance d'autres formes de ce même gène doit être étudiée afin de comprendre quelles voies sont ouvertes pour lutter contre le virus et comment mieux déployer les outils biotechnologiques (**Photo ci-contre**).

Les biotechnologies et en particulier l'édition des gènes, apportent des outils précieux pour comprendre le fonctionnement du vivant. Les progrès dans ces domaines sont rapides et ils ouvrent des opportunités pour la recherche et également

pour ses applications dans différents domaines, comme la création variétale. En Europe, l'utilisation des mutants issus des technologies Crispr est réglementée et reste confinée aux laboratoires et serres sous agrément (directive 2001/18/CE), mais une vive attention est portée à ces nouvelles techniques afin d'évaluer risques et avantages de leur application. /

**LAURA CHAUVIN (INRAE-IGEPP),**  
AVEC LA COLLABORATION DE **SYLVIE MARHADOUR**  
ET **LAURENT GLAIS (FN3PT)**

\* Inrae Institut Jean-Pierre Bourgin, centre de Versailles; Inrae Institut de génétique, environnement et protection des plantes, centre de Bretagne-Normandie; Inrae Unité génétique et amélioration des fruits et légumes, centre Provence-Alpes-Côte-d'Azur.