

Rôle des facteurs d'initiation de la traduction 4E dans la résistance des plantes aux potyvirus : de la découverte des résistances naturelles à l'édition des gènes

eIF4E-mediated resistance to potyviruses in plants: from natural alleles to edited genes

Jean-Luc Gallois¹
Sylvie German-Retana²

¹ Inrae, GAFL, Montfavet, France

² UMR 1332, Biologie du fruit et pathologie, Inrae, Univ. Bordeaux, Équipe de Virologie, 71 avenue Edouard-Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

Article accepté le 13 juin 2023

Résumé. La résistance aux virus est une composante importante de l'amélioration des plantes. La sélection de résistances génétiques aux virus par perte de sensibilité a été sélectionnée chez de nombreuses cultures. Parmi ces résistances, les facteurs d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) ont une place prépondérante.

Ici, nous retraçons les travaux sur le rôle de ces facteurs dans la résistance, principalement vis-à-vis du genre majeur des *Potyvirus*, depuis leur caractérisation il y a 20 ans. En empruntant à des modèles végétaux différents, piment, tomate, tabac et arabidopsis, nous présentons les principales caractéristiques de ces résistances. L'apport de diverses approches biotechnologiques visant à étendre ces résistances à des espèces qui en sont naturellement dépourvues a révélé leur complexité, liée à la redondance génique, leur spécificité, et le compromis existant entre résistance et développement de la plante.

Finalement, nous montrons comment les nouvelles techniques d'édition du génome permettent de développer des résistances génétiques liées aux facteurs eIF4E en créant des allèles qui imitent les allèles fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution chez de nombreuses plantes à intérêt agronomique, et nous discutons de l'intérêt de ces approches en amélioration des plantes.

Mots-clés : Potyvirus, facteurs de sensibilité, eIF4E, résistances naturelles, édition des génomes, plantes

Abstract. Resistance to viruses is an important aspect of plant breeding. One way to achieve it is to select genetic resistances based on the susceptibility factors hijacked by the virus to infect the plants.

Here, we recount work done on genes encoding translation initiation factors eIF4E, some of the most successful targets for obtaining resistance to potyviruses, starting from their characterization 20 years ago. With examples from different plant species, pepper, tomato, tobacco and arabidopsis, we present the basis of this type of resistances and their characteristics, highlighting the role of gene redundancy among 4E factors, their specificity for the virus and the need for the plant of a trade-off between resistance and development.

Finally, we show how the new genome editing techniques could be used in plant breeding to develop eIF4E-based resistances in crops, mimicking the functional alleles that have been selected during evolution in many crops.

Key words : Potyvirus, susceptibility factors, eIF4E, natural resistances, genome edition, plants

Correspondance : Jean-Luc Gallois
<jean-luc.gallois@inrae.fr>

Introduction

L'amélioration des plantes est décisive pour l'agriculture. Elle consiste, pour le sélectionneur, à assembler dans le génome de la plante des gènes ayant pour effet d'améliorer différentes composantes : variété et qualité du fruit, architecture de la plante, résistance aux stress biotiques et abiotiques. Parmi toutes ces composantes, la résistance aux pathogènes, et en particulier aux virus, est très importante. Un grand nombre de virus peuvent infecter les plantes et conduire à des pertes importantes de rendement, que ce soit directement en affectant leur développement, ou en rendant, par exemple, les fruits non commercialisables. Le genre Potyvirus est le plus étendu parmi les virus à ARN simple brin positif. Il comprend des virus d'importance pour la santé des plantes : le virus Y de la pomme de terre (PVY, *tableau 1*), le plum pox virus (PPV, *tableau 1*) responsable de la maladie de la Sharka chez les prunus, etc. Dans une gestion intégrée des maladies virales au niveau des cultures, le levier génétique apparaît fondamental pour promouvoir une agriculture saine en réduisant l'utilisation des pesticides [1, 2].

Pour les virus, les résistances des plantes reposent sur plusieurs mécanismes [2]. Le mode de résistance active, qui a évolué chez les plantes, repose sur une cascade de réactions de défense déclenchées à la suite de la reconnaissance d'un facteur viral par des protéines de la plante appelées récepteurs de type NOD (*nod-like receptors*). Cependant, en particulier pour les virus, une autre classe importante de gènes de résistance correspond à des gènes dits de sensibilité (ou *S gene*). Le principe en est simple :

pour accomplir leur cycle et infecter la plante, les virus, ces parasites intracellulaires obligatoires qui disposent d'un génome réduit codant un petit nombre de protéines, doivent détourner des facteurs des cellules hôtes. On peut supposer que si, chez une plante ces facteurs sont modifiés ou absents, donc non disponibles pour le virus, la plante sera résistante. On parle alors de résistance par perte de sensibilité, une forme de résistance passive. Ces gènes de résistance sont à déterminisme génétique récessif : il faut que toutes les copies du gène soient mutées pour que la plante soit résistante.

Dans cette revue, nous proposons un survol de la découverte et de l'état des connaissances acquises sur les facteurs d'initiation de la traduction 4E chez les plantes, à ce jour le facteur de sensibilité le plus ubiquitaire dans le développement de résistance aux potyvirus. À partir de l'étude de résistances chez quatre espèces, le piment (*Solanum capsicum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), nous présentons les caractéristiques générales de ces résistances, et discutons des meilleures manières de les mettre en œuvre chez les plantes. Le rôle des facteurs 4E ne se limite pas aux plantes, et plusieurs publications ont aussi mis en évidence le rôle des facteurs de l'initiation de la traduction sur les virus à ARN affectant les animaux, dont ceux appartenant à la famille des *Caliciviridae* (ordre des *Picornavirales* : genres Vesivirus, Norovirus). Cependant, c'est bien chez les plantes qu'un rôle important dans la résistance a été établi, et ces connaissances peuvent aussi éclairer la biologie de l'initiation de la traduction chez les animaux [3].

Tableau 1. Liste des principaux virus cités dans cette revue.

Espèce virale (nom en français/anglais)	Acronyme	Genre	Famille
Virus Y de la pomme de terre/ <i>Potato virus Y</i>	PVY		
Virus de la gravure du tabac/ <i>Tobacco etch virus</i>	TEV		
Virus de la veine jaune du trèfle/ <i>Clover yellow vein virus</i>	CIYVV		
Virus de la mosaïque de la laitue/ <i>Lettuce mosaic virus</i>	LMV	Potyvirus	<i>Potyviridae</i>
Virus de la variole du prunier/ <i>Plum pox virus</i>	PPV		
Virus de la mosaïque du navet/ <i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV		
Virus marocain de la mosaïque de la pastèque/ <i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	MWMV		
Virus de la striure brune du manioc/ <i>Cassava brown streak virus</i>	CBSV	Ipomovirus	
Virus de la mosaïque jaune de l'orge/ <i>Barley yellow mosaic virus</i>	BaYMV	Bymovirus	
Virus des ondulations du navet/ <i>Turnip crinkle virus</i>	TCV	Betacarmovirus	<i>Tombusviridae</i>
Virus des spots nécrotiques du melon/ <i>Menon necrotic spot virus</i>	MNCV	Gammacarmovirus	
Virus du fruit rugueux brun de la tomate/ <i>Tomato brown rugose fruit virus</i>	ToBRFV	Tobamovirus	<i>Virgaviridae</i>

Mise en évidence du rôle des facteurs eIF4E dans la résistance aux potyvirus chez arabidopsis et chez le piment

Théoriquement, il existe plusieurs manières de mettre en évidence le rôle d'un facteur de sensibilité aux virus : interactions entre protéines virales et protéines de plante, analyse de mutants chez la plante modèle *A. thaliana*, approche par gène candidat. Il est intéressant de noter que le rôle majeur des facteurs eIF4E a été révélé simultanément, il y a vingt ans, par deux approches distinctes sur deux plantes très différentes. D'une part, l'étude de mutants générés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames ou arabidopsis) a démontré comment des plantes mutantes pour le facteur dit « eIFiso4E » (*eukaryotic Initiation Factor isoform 4E*) présentaient une résistance totale à certains potyvirus tel que le turnip mosaic virus (TuMV, *tableau 1*) [4, 5]. D'autre part, une équipe de l'Inrae d'Avignon, qui travaillait sur la résistance au PVY des poivrons et piments (espèces *Capsicum*), a montré par une approche par gène candidat que ces résistances étaient causées par des formes variantes du gène codant le facteur eIF4E [6]. Dans ce cas, il est intéressant de noter que ces résistances chez le piment i) affectent un autre gène *eIF4E* que le gène *eIFiso4E* décrit chez arabidopsis (voir *figure 1A* pour la famille des facteurs 4E) et ii) ne résultent pas en une inactivation du gène *eIF4E* mais d'une ou plusieurs mutations dans la portion codante du gène, entraînant des changements d'acides aminés dans la protéine eIF4E. Ces apparentes contradictions préfiguraient la grande plasticité des résistances liées aux facteurs 4E chez les plantes.

Dans la foulée de ces publications, un grand nombre ont suivi, basées sur une approche par gène candidat chez de nombreuses cultures d'intérêt agronomique, montrant que des gènes de résistances aux potyvirus, utilisés depuis longtemps dans les programmes d'amélioration de nombreuses plantes à intérêt agronomique, reposaient en fait sur des mutations de ces facteurs eIF4E, que ce soit chez la laitue [7], la tomate, le pois, ou le melon (pour une revue extensive, voir [8]). Un point marquant est que les mutations responsables de la résistance chez toutes ces espèces sont majoritairement associées à des changements d'acides aminés dans deux régions dites I et II de la protéine eIF4E (*figure 1B*). Ces résistances ne sont pas limitées aux potyvirus mais s'étendent à d'autres genres de virus à ARN positif simple brin comme les *Bymovirus* (résistance de l'orge au barley yellow mosaic virus, *tableau 1*) ou les *Carmovirus* (résistance du melon au melon necrotic spot virus, un virus à ARN positif simple brin dépourvu de coiffe et de

VPg à l'extrémité 5', et de queue polyadénylée à l'extrémité 3', *tableau 1*) [9, 10]. À cette époque, on soupçonnait aussi que le gène de résistance va au PVY chez le tabac était lié au facteur 4E. Mais l'approche par gène candidat menée pour le prouver s'est avérée infructueuse, compte tenu de la polyploïdie de cette plante cultivée. Ce n'est que plus tard, grâce au séquençage à haut débit du transcriptome de lignées de tabacs recombinantes (RIL) résistantes et sensibles, qu'il a été démontré qu'une délétion d'une copie eIF4E est responsable de la résistance *va* chez le tabac [11]. En conclusion, le début des années 2000 a positionné eIF4E comme un facteur central des résistances récessives aux potyvirus. Pour illustrer son importance, nous présentons deux pathosystèmes emblématiques, qui sont i) celui comprenant le piment et deux potyvirus (PVY et tobacco etch virus, TEV) et ii) celui recouvrant arabidopsis et plusieurs autres potyvirus.

L'exemple de la coévolution piment-potyvirus

Les études qui ont suivi ont illustré la grande richesse des résistances aux potyvirus associées aux facteurs eIF4E chez les espèces *Capsicum*. Au cours de plusieurs études successives, pas moins de 35 allèles de résistance aux espèces de potyvirus PVY et TEV ont été isolés [12-14]. De manière intéressante, certains de ces allèles sont contournés par des isolats évolués du PVY ou TEV et il a été rapidement démontré que ce contournement repose sur la sélection de variants viraux associés à des mutations dans la séquence qui code une protéine virale dite VPg (*Viral Protein genome-linked*). Une expérience simple mais décisive a montré que pour le pathosystème piment/potyvirus, on peut mettre en évidence une interaction protéine-protéine entre eIF4E et VPg de couples piment-virus « compatibles » mais pas entre couples « incompatibles », ce qui permet de définir cette interaction comme un déterminant majeur de la sensibilité/résistance aux virus [12]. Ceci a permis de proposer un modèle simple de coévolution entre le piment et le PVY (*figure 2*). Si le virus peut recruter le facteur eIF4E *via* sa VPg, la plante est sensible (*figure 2-(1)*). Dans la descendance des plantes, celles portant des mutations dans les régions I et II du gène *eIF4E* (qui abolissent l'interaction entre les protéines eIF4E et VPg) sont sélectionnées car résistantes au virus (*figure 2-(2)*). Le nombre d'allèles différents laisse suggérer qu'il y a de nombreuses voies pour supprimer cette interaction et atteindre « l'état de résistance ». Ainsi, de nouvelles variétés résistantes de piments sont sélectionnées et implantées. Des variants (dits contournants) de potyvirus (PVY ou TEV)

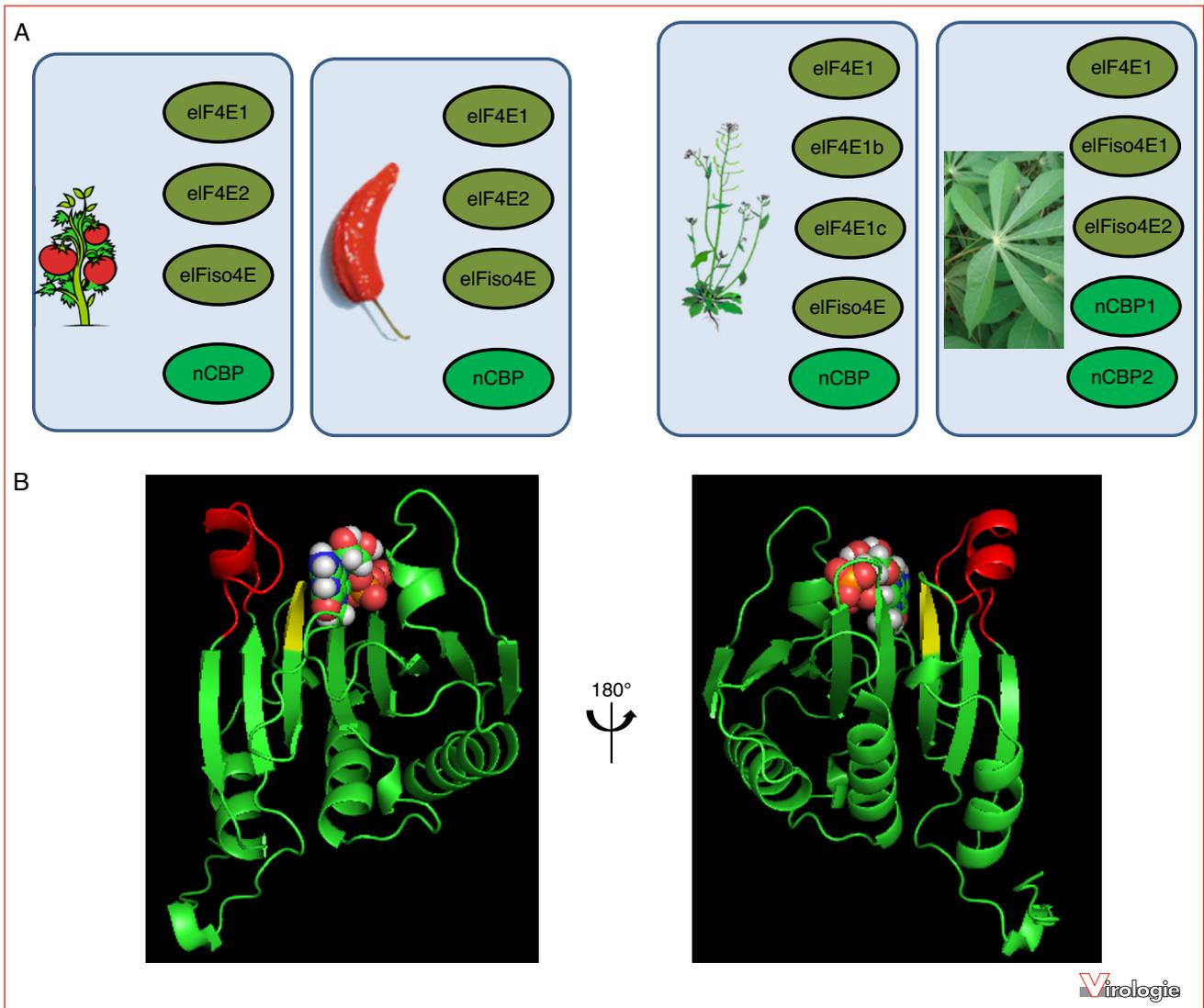


Figure 1. Les facteurs d'initiation de la traduction 4E chez quelques plantes. A. Organisation de la famille de facteurs d'Initiation de la traduction 4E chez quelques plantes. De gauche à droite, la tomate (*Solanum lycopersicum*), le piment (*Solanum capsicum*), l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) et le manioc (*Manihot esculenta* Crantz). B. Modélisation de la structure 3D de la protéine eIF4E1 de piment. Les régions I et II, où se localisent la plupart des mutations associées à la résistance aux potyvirus, sont représentées respectivement en rouge et en jaune. L'analogue de coiffe d'ARNm est représenté par la structure en boules multicolores situées dans la partie concave de la protéine.

eIF4E : eukaryotic Initiation Factor 4E ; eIFiso4E : eukaryotic Initiation Factor isoforme 4E ; nCBP : novel Cap Binding Protein, aussi appelé 4E-HP.

peuvent cependant émerger sur ces variétés, réduisant les résistances à néant et entraînant la sélection de nouveaux allèles de résistance (figure 2-(3)). Et ainsi, de manière itérative, on peut supposer que la culture de piment sous forte pression de sélection de pathogènes a pu conduire à cette étonnante diversité d'allèles de résistance au sein de la variabilité naturelle du piment et du poivron. Il faut noter qu'au-delà de cette diversité, le

pathosystème piment/potyvirus a permis de mieux caractériser les forces évolutives et l'architecture génétique gouvernant la durabilité ou le contournement de ces résistances, un point que nous ne développons pas ici (pour revue voir [14]).

Il peut paraître étonnant cependant que ces mécanismes aient eu recours à des variants du gène *eIF4E* alors que conceptuellement, il semble plus efficace de « perdre »

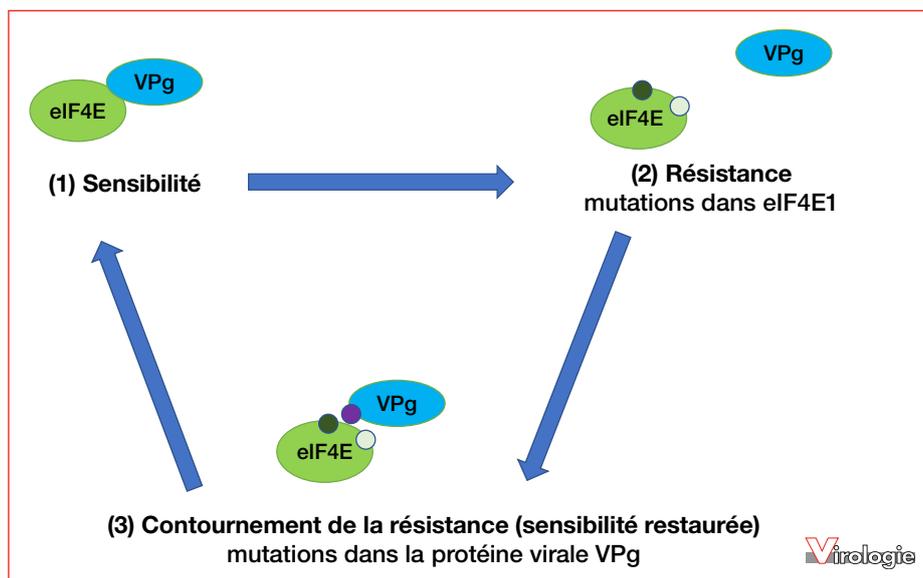


Figure 2. Cycle de co-évolution entre les facteurs de sensibilité eIF4E et les potyvirus. (1) Le recrutement du facteur de sensibilité eIF4E par le virus (représenté par sa VPg, *Viral Protein genome-linked*) permet au virus d'accomplir son cycle infectieux. La plante est sensible. (2) Chez certaines plantes, l'acquisition de mutations (changements d'acides aminés) dans eIF4E rompt l'interaction avec la VPg, la plante est résistante au virus. (3) L'acquisition de mutations dans le génome viral, souvent associées à des changements d'acides aminés dans la VPg, rétablit l'interaction avec eIF4E. La résistance est contournée et la plante devient sensible à la souche virale évoluée. De nouveaux allèles de résistance pourront être sélectionnés.

directement le gène responsable de la sensibilité. D'autant plus que l'étude d'autres pathosystèmes, comme tabac/PVY, suggère que cette hypothèse est une solution envisageable : le gène *va*, responsable de la résistance du tabac au PVY, n'est pas un allèle naturel mais a été obtenu après mutagenèse induite par rayon X, provoquant une grande délétion de près de 1 Mb du chromosome 21 et donc la perte d'une copie du gène *eIF4E* [11]. De même, les nombreuses résistances d'arabidopsis aux potyvirus sont associées à des pertes de fonctions.

Utilisation sélective des facteurs eIF4E chez arabidopsis

Au-delà des multiples avantages du modèle génétique d'*Arabidopsis thaliana*, le séquençage très précoce de son génome en 2000 a constitué une avancée considérable, de même que la disponibilité de nombreuses banques de mutants d'insertions, permettant de mener des approches de génétique inverse. Pour le sujet qui nous intéresse, et en contraste certain avec le piment (dont seule une approche par gène candidat a permis la caractérisation du gène *eIF4E*), la composition de la petite famille multigénique codant les facteurs 4E a été rapidement caractérisée, à savoir *eIF4E1*, mais aussi deux gènes très

proches – peu ou pas exprimés –, un gène codant un facteur plus court – appelé improprement isoforme – eIFiso4E, et un dernier gène codant un facteur atypique, découvert d'abord chez les plantes [15] et appelé nCBP (*new Cap Binding Protein* ou 4E-HP chez les animaux) (*figure 1*).

Alors que les expériences initiales ont montré que l'inactivation du facteur eIFiso4E est à l'origine de la résistance aux TuMV et TEV, l'équipe du professeur Uyeda a montré que des mutants du gène *eIF4E1* sont résistants à une autre espèce de potyvirus, le virus de la mosaïque du trèfle (CIYVV, *tableau 1*) [16]. Ce résultat très intéressant suggère que les potyvirus peuvent détourner l'un ou l'autre des facteurs eIF4E ou eIFiso4E de la plante [17]. Enfin, la résistance de ces mutants dits « nuls » (*i.e.* le gène de sensibilité est totalement inactivé) peut également être contournée par des variants du virus : ainsi des mutations au sein de la portion codant la VPg du TuMV permettent au virus de contourner la résistance des plantes mutées pour le facteur eIFiso4E, ce qui suggère que le virus peut recruter un autre facteur qu'eIFiso4E pour effectuer son cycle dans la plante [18].

Un intérêt de ces travaux est de montrer que des approches d'inactivation de gène *eIF4E* (plus faciles à mettre en place par mutagenèse) permettent de mettre en place des résistances *de novo* chez les plantes

dépourvues de résistances naturelles, mais la durabilité de ces résistances n'est alors pas assurée. D'autre part, la sélectivité de virus distincts pour les différents facteurs 4E suggère que le spectre de résistance des plantes peut être limité. Il paraît alors évident de combiner, dans la même plante, des mutations KO affectant *eIFiso4E* et *eIF4E1* pour essayer d'étendre le spectre de résistance de la plante. Or, cette combinaison est létale au niveau gamétophytique [19] : vu le rôle primordial des facteurs 4E dans l'initiation de la traduction chez les plantes, on peut s'attendre à ce que, du fait de la redondance génique, une mutation d'un facteur 4E a un effet modéré sur le développement de la plante, mais l'effet sur le développement est aggravé quand on combine des mutations dans plusieurs facteurs 4E distincts.

Ces travaux révèlent ainsi une limite de la mise en place de résistance par une approche perte de fonction. Le développement d'une stratégie similaire chez la tomate et le tabac a renforcé cette conclusion.

Approches par perte de fonction chez la tomate et le tabac, et limites liées à la redondance génique

Bien que les résistances liées à *eIF4E* ont été sélectionnées chez de nombreuses espèces à intérêt agronomique, elles semblent ne pas être disponibles pour certaines plantes vis-à-vis desquelles les potyvirus représentent un enjeu agronomique majeur : on peut citer la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) vis-à-vis du PVY et le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) vis-à-vis d'un ipomovirus, le cassava brownstreak virus (CBSV, *tableau 1*) qui entraîne un noircissement de la racine et le rend impropre à la consommation. Pouvoir mettre en place, chez de telles espèces, un mécanisme de résistance par une approche biotechnologique représente un enjeu considérable. Du fait de leur appartenance à la même famille des Solanacées que le piment et la pomme de terre, et son statut d'espèce modèle, la tomate était toute désignée pour mener une étude de preuve de concept. De plus, à l'instar du piment, des allèles de résistance au PVY et TEV très efficaces ont été isolés chez des accessions sauvages (*Solanum habrochaites*, accession PI24) [20] : il est donc possible de comparer le spectre de résistance associé à l'allèle naturel issu de PI24 (comportant huit changements en acides aminés et conférant une résistance à large spectre) avec celui que l'on peut obtenir par inactivation du gène *eIF4E1* au sein de l'espèce cultivée *Solanum lycopersicum*.

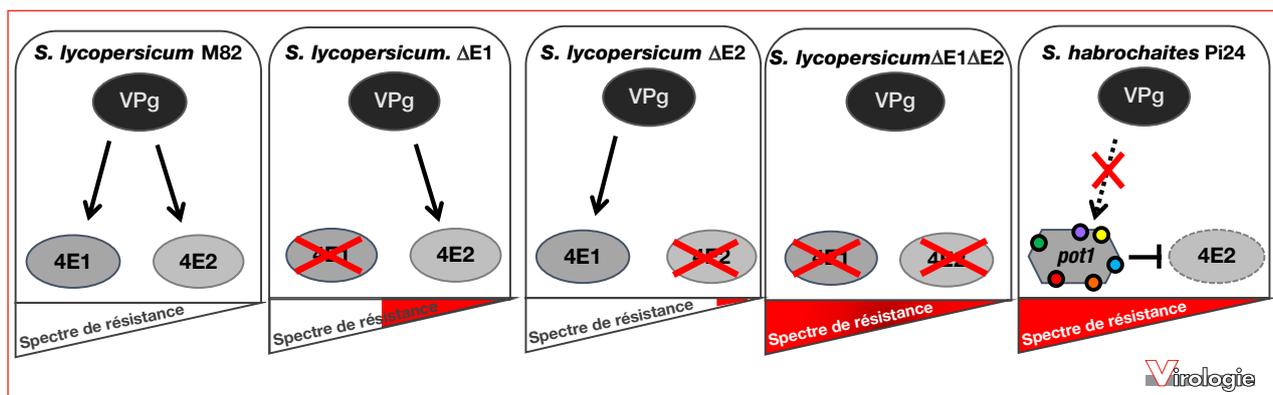
Une telle lignée de tomate chez laquelle le gène *eIF4E1* a été inactivé a été isolée à partir du criblage d'une

population de mutants de tomates à gros fruit (de type cultivé, type M82), obtenus par une approche TILLING [21]. Les plantes se développent normalement mais leur spectre de résistance à plusieurs espèces et isolats de potyvirus s'avère être excessivement étroit, contrairement à celui associé à l'allèle naturel d'*eIF4E1* issu de l'accession PI24 [22]. La plante chez laquelle *eIF4E1* est inactivé est sensible à la plupart des isolats de PVY et TEV testés. Des études de génétique ont permis de montrer que cette limitation du spectre de résistance est causée par une duplication du gène *eIF4E* chez les Solanacées, où *eIF4E1* et *eIF4E2* codent des protéines très homologues (*figure 3*). Ainsi en l'absence d'*eIF4E1*, la plupart des isolats de potyvirus peuvent recruter *eIF4E2*. Des travaux complémentaires ont permis de mettre en évidence que l'inactivation seule de *eIF4E2* a un impact faible sur la résistance aux potyvirus (en termes de nombre d'isolats viraux contrôlés) [23], alors qu'une combinaison des deux mutations sur *eIF4E1* et *eIF4E2* permet de générer un spectre de résistance quasiment identique à celui conféré par l'allèle sauvage issu de PI24 (*figure 3*) [22]. En revanche, le développement des plantes doublement mutées est fortement compromis : les plantes sont naines, leur architecture est fortement altérée : en aucun cas, cette double inactivation ne semble utilisable dans un programme d'amélioration des plantes.

Un parallèle peut être fait avec le pathosystème tabac/PVY. Chez le tabac, qui possède au moins six gènes *eIF4E* [24], il s'avère qu'une délétion complète du gène *eIF4E-1* entraîne un spectre de résistance et une durabilité de la résistance au PVY beaucoup plus grands que toute autre forme de mutation impactant *eIF4E-1*, comme chez certains mutants TILLING. Des travaux de génétique et d'analyse d'expression de gènes ont permis de proposer un modèle où la surexpression de la copie *eIF4E-2*, sous l'effet de la délétion complète du gène *eIF4E-1* et partielle du gène *eIF4E-3*, sert de leurre pour la VPg et limite l'apparition de variants contournants, augmentant ainsi la durabilité de la résistance contrôlée par la délétion de *eIF4E1* [24].

Un changement de stratégie rendu possible par l'édition du génome

Les résultats obtenus par inactivation des gènes *eIF4E* chez la tomate entraînent une remise en question de cette approche pour mettre en place des résistances, en concordance avec des résultats similaires obtenus sur différents modèles de plantes (pour revue, voir [25]). En résumé, il semble que les allèles naturels de résistance,



Virologie

Figure 3. La redondance génique entre eIF4E1 et eIF4E2 limite la mise en place de résistance par inactivation chez la tomate. Les produits des gènes *eIF4E1* et *eIF4E2* sont représentés, ainsi que les potyvirus sous la forme de la VPg. Les mutants nuls obtenus par mutagenèse (TILLING) sont barrés d'une croix rouge. Une flèche pleine indique la sensibilité de la plante au virus. Chaque spectre de résistance est représenté par la jauge située sous chaque génotype et colorée en rouge : le niveau de coloration rouge représente la résistance à un plus ou moins grand nombre d'isolats de potyvirus. Le témoin sensible (M82) est lui totalement sensible. Seule l'inactivation simultanée des gènes *eIF4E1* et *eIF4E2* permet de rétablir un spectre de résistance égal à celui observé chez le variant naturel *pot1*, provenant de la variabilité naturelle d'une tomate sauvage (*Solanum habrochaites* PI24). La barre d'inhibition sur le dernier panneau à droite indique que la présence de l'allèle de résistance naturel (*pot1*) empêche le recrutement de 4E2 par le virus (mécanisme sous-jacent inconnu). Pour plus d'information, voir Gauffier *et al.*, 2016 [22].

associés à des changements d'acides aminés au sein de régions spécifiques du gène *eIF4E*, confèrent des résistances efficaces (potentiellement à spectre de résistance large) qui sont peu contournées (pour les meilleurs allèles) et cela, sans effet sur le développement. À l'inverse, les allèles nuls induits par mutagenèse et inactivation présentent des spectres de résistance plus étroits, fréquemment contournés et des défauts de développement de la plante. On pourra, à ce stade, noter que les allèles naturels codent des protéines eIF4E fonctionnelles pour l'initiation de la traduction (leur rôle premier dans la physiologie de la cellule) alors que les allèles nuls sont susceptibles de déréguler la machinerie d'initiation de la traduction de la cellule. Une conclusion évidente au vu de cette observation est que, plutôt que d'inactiver les gènes *eIF4E*, une approche basée sur une imitation des variants fonctionnels d'eIF4E serait plus efficace.

De plus, du fait de leur caractérisation précoce il y a plus de vingt ans, les gènes *eIF4E* ont été utilisés comme preuve de concept (« *proof of concept* ») et ont accompagné l'évolution des approches biotechnologiques (*RNAi* et *TILLING*) pour générer des résistances ([21, 26] pour revue, [27]). En moins de dix ans, les méthodes d'édition du génome, dérivées de la technologie CRISPR-Cas9, développées notamment par les équipes d'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna (prix Nobel de chimie 2020), ont eu un impact considérable sur la manière d'aborder la modification des

génomés. En biologie végétale, leur application la plus simple permet de générer des cassures double brin au niveau de régions très précises de l'ADN génomique, ce qui, suite à des mécanismes de réparation approximatifs, peut aboutir à la production d'allèles nuls. Plusieurs équipes ont pu ainsi générer, chez diverses espèces (arabidopsis, concombre, tomate, etc...), des résistances associées à l'inactivation de facteurs 4E [28-30]. Cependant, celles-ci présentent les mêmes limitations que celles rapportées ci-dessus (*cf.* § « Approches par perte de fonction chez la tomate et le tabac : limites liées à la redondance génique ») : ainsi, il a été démontré récemment qu'une résistance établie chez le melon par inactivation du gène *eIF4E* est rapidement contournée par le virus marocain de la mosaïque de la pastèque (moroccan watermelon mosaic virus, MWMV, *tableau 1*) et est associée à une stérilité mâle de la plante [31].

En revanche, les développements ultérieurs de la méthodologie d'édition des génomes telle que la méthode d'édition de base, puis de *Prime Editing*, ouvrent la porte à des modifications précises (au nucléotide près) de la séquence des gènes ciblés (pour plus de détails sur ces méthodes et leur application à la résistance aux pathogènes chez les plantes, voir la revue [32]).

C'est dans ce cadre que nous avons voulu affiner notre connaissance de la contribution des différentes mutations conférant la résistance aux gènes *eIF4E*.

Vers une imitation des allèles naturels de résistance *eIF4E* chez arabidopsis et chez la tomate

Les allèles de résistance, qui ont été sélectionnés chez les plantes d'intérêt agronomique, sont souvent caractérisés par la présence simultanée de plusieurs mutations associées à des changements d'acides aminés. Connaître la contribution relative de chaque mutation reste difficile à évaluer. Arabidopsis, par sa facilité de culture et de transformation, représente un modèle idéal pour tenter

de mener une telle étude [33,34] d'autant plus que chez cette plante modèle, aucun allèle de résistance naturelle *eIF4E* n'a été identifié.

Un premier enjeu était de savoir si un allèle de sensibilité *eIF4E1* pouvait être converti en allèle de résistance, cela en copiant des mutations acquises au cours de l'évolution chez d'autres espèces cultivées. Pour cela, un système de complémentation d'*eIF4E1* par transgénèse a été mis en place (figure 4). Un mutant d'arabidopsis, chez qui le gène *eIF4E1* est inactivé, a été complétement par transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*, à l'aide d'un T-DNA portant une copie du gène

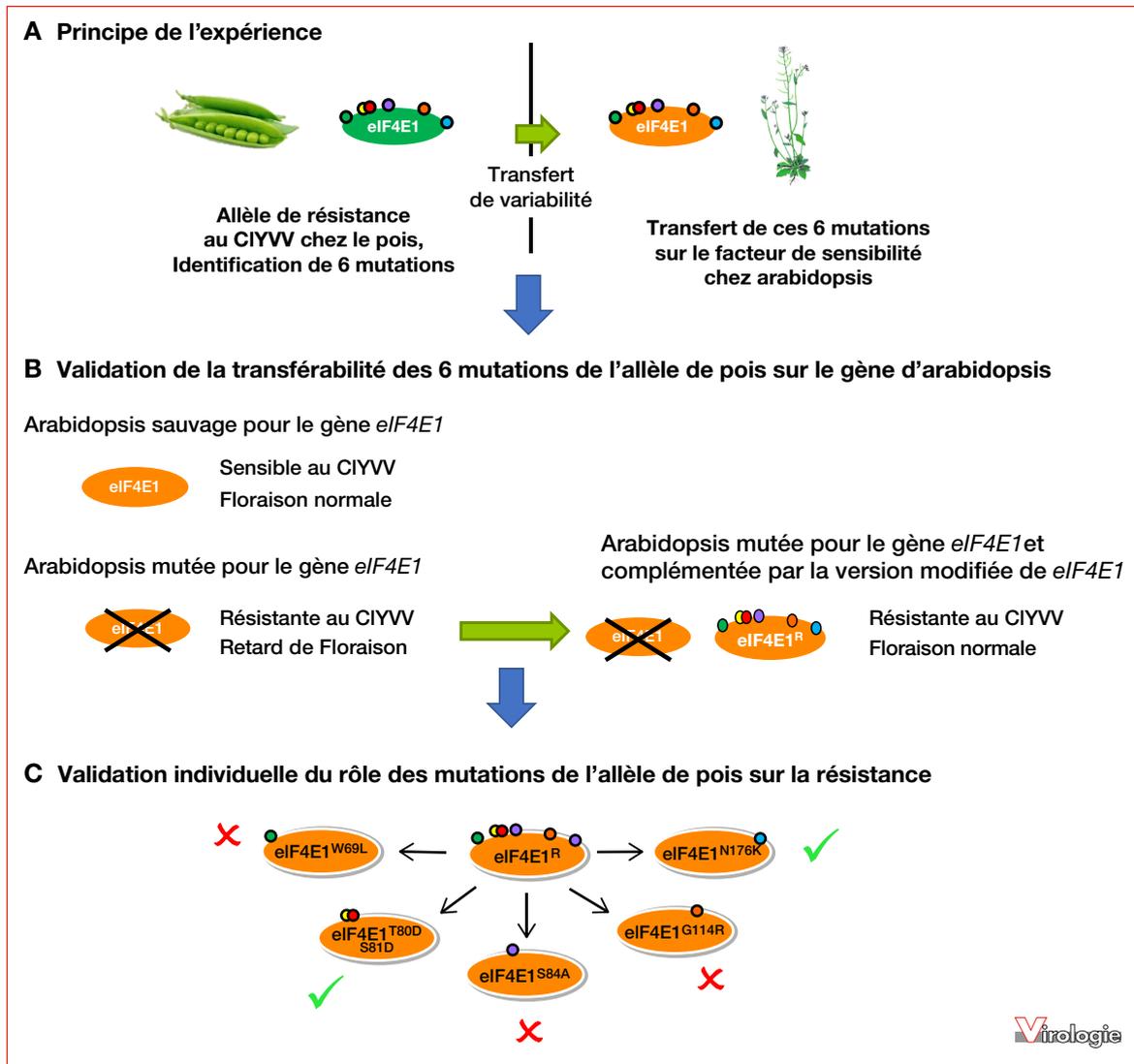


Figure 4. Utilisation d'arabidopsis pour transférer des signatures de résistance d'une espèce à une autre.

eIF4E1 sauvage : cette construction a permis de compenser totalement les phénotypes associés à la mutation dans *eIF4E1*, c'est-à-dire, de restaurer la sensibilité au CIYVV (*cf.* § « Utilisation sélective des facteurs eIF4E chez arabidopsis ») mais également de compléter un retard de la montée à fleur associé à l'inactivation d'*eIF4E1*. À partir de là, un allèle synthétique du gène *eIF4E1* d'arabidopsis a été conçu : il intègre six mutations associées à six changements d'acides aminés dans plusieurs régions de la protéine eIF4E1, toutes situées dans les boucles entourant la zone de liaison à la coiffe (*figure 4B*). Les plantes mutées pour *eIF4E1* et complétées par cet allèle synthétique présentent une montée à fleur de type sauvage (*i.e.* la protéine eIF4E1 modifiée est fonctionnelle) tout en restant résistantes au CIYVV : la transposition des mutations permet donc bien de générer un allèle fonctionnel de résistance. Cet allèle peut être cumulé à un mutant nul du gène *eIFiso4E* et donner naissance à un spectre de résistance vis-à-vis de toutes les espèces et les isolats de potyvirus que nous avons pu tester, y compris des isolats capables de détourner simultanément eIF4E1 et eIFiso4E, et vis-à-vis desquels aucune résistance liée à eIF4E/eIFiso4E n'a été mise en évidence [33].

Dans un deuxième temps, le même procédé de complémentation a été suivi mais en introduisant les mutations une à une (*figure 4C*). Ceci a permis de montrer que certaines mutations simples permettent à elles seules de générer des résistances au CIYVV sans affecter le développement de la plante. C'est le cas de deux types de mutations qui changent fortement le potentiel électrostatique de surface de la protéine eIF4E1, ce qui pourrait agir de manière répulsive sur la liaison à des protéines virales. Finalement, une de ces mutations (dite N176K car elle entraîne le remplacement de l'asparagine en position 176 de la protéine eIF4E1 en lysine) a été introduite par édition de base dans une lignée d'arabidopsis sauvage (*figure 5A et 5B*) : la modification de base (C en G) a été introduite par transformation d'un ADN de transfert (T-DNA) permettant à la fois l'expression d'une séquence ARN guide (sgRNA, qui permet de cibler la région du génome visée) et la protéine chimère nCas9 fusionnée à une cytidine désaminase (qui modifie une cytidine à la position visée). Ceci a permis, par autofécondations successives, l'obtention de plantes dépourvues de transgène mais modifiées au niveau du codon ciblé à l'état homozygote : comme attendu, ces plantes – non transgéniques mais portant une mutation indiscernable d'une mutation survenue

naturellement – présentent une résistance au CIYVV sans effet sur le développement des plantes [34].

Un travail similaire a été mené chez la tomate (*figure 5B*) : Kuroiwa *et al* [35] ont pu éditer les deux régions principales (région I et II) de la protéine eIF4E1 de tomate permettant ainsi de transformer ce facteur de sensibilité en gène de résistance vis-à-vis de plusieurs espèces de potyvirus, dont deux isolats de PVY. Ces résultats ouvrent la voie à des applications chez les plantes à intérêt agronomique, dont la pomme de terre.

Perspectives pour l'amélioration des plantes et futures directions

L'ensemble des travaux présentés ici indiquent que l'utilisation par les virus à ARN simple brin positif des facteurs d'initiation de la traduction, et principalement la famille des facteurs eIF4E, semble être nécessaire pour l'accomplissement du cycle viral. On pourra noter que les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance conférée par ces facteurs ne sont toujours pas clairement élucidés même si, à l'instar des travaux sur les virus animaux, les études montrent un effet très important sur la traduction des protéines virales [36, 37].

La richesse des mutations susceptibles de convertir un allèle de sensibilité 4E en allèle de résistance peut expliquer la grande diversité d'allèles trouvés au sein de la variabilité des espèces végétales : il existe un grand nombre de voies pour acquérir un phénotype de résistance. Il est intéressant de noter que ces mutations sont transposables d'une espèce de plante à une autre, avec pour cela deux applications possibles :

- D'une part, on peut rechercher, directement dans la variabilité de l'espèce, les accessions portant des mutations (changements d'acides aminés) qui sont des signatures de résistance, on parle d'*allele mining*. Une preuve de concept a été menée chez la tomate [38] et la disponibilité de données de séquençage de la variabilité naturelle pour une espèce, rend cette approche pleinement réalisable.
- D'autre part, il est possible de reporter ces mutations par édition de génome, comme démontré chez arabidopsis (voir ci-dessus), mais également chez la tomate. Dès lors, une stratégie de développement de résistance chez une espèce peut consister à :
 - i) définir la famille de gènes 4E dans l'espèce ;
 - ii) identifier lesquels, parmi eux, constituent les facteurs de sensibilité aux potyvirus concernés
 - et ; iii) éditer ces facteurs.

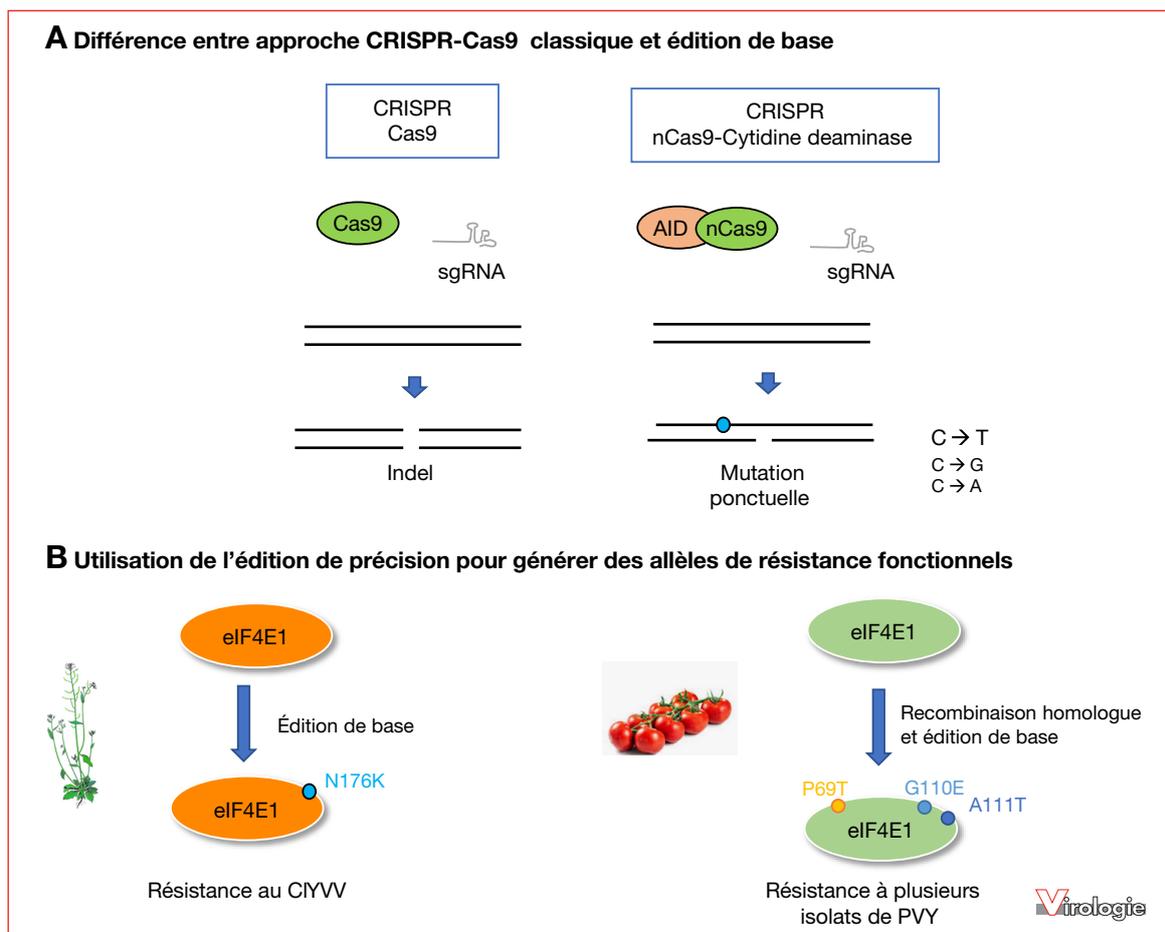


Figure 5. Les mécanismes d'édition de base permettent d'imiter des allèles de résistance naturels. A. Différence entre l'édition classique par CRISPR-Cas9 et l'édition de base. L'édition classique (à gauche) permet d'introduire une cassure double brin par la nucléase Cas9 suite à la reconnaissance de la région ciblée à l'aide d'un ARN guide (sgRNA) et entraîne une insertion/délétion de bases (indels). Dans le cas de l'édition de base (à droite), la Cas9 ne coupe qu'un seul brin (version nickase : nCas9) et est couplée à une cytidine désaminase (AID pour *Activation-induced cytidine deaminase*) qui va modifier la base cytidine ciblée. Ceci causera des défauts de réparation sur le brin complémentaire et ainsi des mutations ponctuelles. B. Illustration de l'édition précise des gènes *eIF4E* utilisée pour générer des résistances aux potyvirus chez arabidopsis et chez la tomate.

– Plusieurs outils peuvent aider à la prise de décision, tels que les études d'interactions protéine-protéine et/ou les logiciels de modélisation 3D de protéines [12,33]. Il est aussi fondamental de bien étudier en amont la durabilité des allèles de résistance mis en place : là encore, les leçons acquises par l'observation des allèles naturels suggèrent que l'accumulation de mutations dans plusieurs régions du gène codant *eIF4E* est importante pour générer des allèles de résistance durable à large spectre. On voit aussi à quel point cette approche semble indissociable de l'avancée des progrès de l'édition des génomes, dont les techniques de

Prime Editing (permettant d'introduire à façon toutes les mutations – *i.e.* changements d'acides aminés possibles) et la mise en place de ces méthodes pour les espèces de plantes récalcitrantes à la transformation [39, 40]. Enfin, l'utilisation de ces nouvelles méthodes pour l'amélioration des plantes dépend de leur acceptabilité en Europe. Depuis 2018, les plantes résultant de l'édition du génome relèvent de la législation régulant les OGM (arrêté de la Cour de justice européenne dans le cas C-528/16). Cependant, un rapport de la Commission européenne en 2021 appelle à définir un nouveau cadre juridique car « la légis-

lation actuelle sur les OGM, adoptée en 2001, n'est pas adaptée à ces technologies innovantes »¹). À ce jour aucune plante « éditée » n'est cultivée en Europe mais leur utilisation a été dérégulée en mars 2023 au Royaume-Uni².

Cependant, les potyvirus sont loin d'être les seuls virus à ARN simple brin positif à affecter les plantes d'intérêt agronomique. Des résistances associées à d'autres genres viraux (carmovirus chez le melon) ont également été mises en évidence, mais les travaux menés sur la conception d'allèles de résistance chez *Arabidopsis* montrent que les mutations sélectionnées vis-à-vis des potyvirus sont principalement efficaces vis-à-vis de ce genre viral chez cet hôte. Elles ne sont pas ou peu efficaces vis-à-vis des népovirus (dont le virus responsable de la maladie du court-noué chez la vigne), des polerovirus (dont les virus responsables de la jaunisse de la betterave), des cucumovirus ou des carmovirus (comme le turnip crinkle virus (TCV, *tableau 1*) [33]. Compte tenu des différences structurelles existant entre ces virus (notamment présence ou non de la protéine VPg et grande diversité de tailles et séquences des VPg), ces virus détournent bien les facteurs eIF4E, mais probablement selon des modalités différentes. Plusieurs articles montrent que les facteurs eIF4E peuvent directement interagir avec l'ARN viral, qu'il s'agisse de l'entrée interne des ribosomes (IRES) ou d'élément traductionnel indépendant de la coiffe (3'CITE) [41]. Mais on peut également supposer des interactions différentes entre les facteurs 4E et les protéines virales. C'est le cas du pathosystème laitue/virus de la mosaïque de la laitue (LMV, *tableau 1*) qui représente l'un des rares exemples où la résistance conférée par des mutations du facteur eIF4E peut être contournée par des isolats viraux ayant acquis des mutations dans une autre protéine que la VPg, la protéine CI responsable de la formation de inclusions cylindriques [42, 43]. Un des enjeux pour identifier de nouvelles résistances consisterait à caractériser ces autres interactions potentielles et les régions d'interaction pour tenter de prédire des mutations susceptibles de conférer une résistance.

Le « succès » des facteurs eIF4E pour les résistances aux virus, ne doit pas cacher qu'ils ne sont pas les seuls facteurs de l'hôte détournés par les potyvirus. Il est intéressant de se demander la raison de leur rôle prépondérant dans les résistances qui ont été sélectionnées lors de la domestication et l'amélioration des plantes. Une raison

pourrait être, qu'en dépit de leur redondance, les diverses copies de 4E sont suffisamment différenciées (eIF4E, eIFiso4E, nCBP) pour permettre une redondance fonctionnelle pour la plante, tout en étant recrutées de façon sélective par une espèce virale donnée. Au-delà des facteurs 4E, on peut citer la caractérisation de la *Protein Disulfide Isomerase Like 5-1 (PDIL5-1)* chez l'orge (*Hordeum vulgare*) comme facteur de sensibilité aux bymovirus (genre de la famille des *Potyviridae*) [44]. L'inactivation de ce gène par édition du génome procure à la plante une résistance sans entraîner de pénalité de croissance [45]. On pourra également noter que cette redondance peut aussi être déjouée par l'inactivation de plusieurs gènes homologues à la fois grâce à la technologie CRISPR-Cas9 : c'est le cas des gènes *TObamovirus Multiplication* de tomate (*SITOM*) dont l'inactivation simultanée (jusqu'à quatre gènes) permet de générer une résistance au tobamovirus émergent tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV, *tableau 1*) [46, 47].

Il existe donc de nombreux facteurs de sensibilité, autres que les facteurs d'initiation de la traduction intervenant à différents stades du cycle (traduction, réplication, mouvement de cellule à cellule). Ces facteurs représentent un très fort potentiel pour développer de nouvelles résistances vis-à-vis des virus présents et des nouveaux virus/isolats qui pourraient survenir dans l'agriculture de demain, permettant de contribuer à la mise en place d'une agriculture saine et durable.

Remerciements : Nous tenons à remercier l'ensemble de la communauté scientifique qui a œuvré sur ce sujet depuis plus de 20 ans, et en particulier les équipes de l'Inrae d'Avignon (GAFL et PV) et de l'Inrae de Bordeaux (BFP). Nous sommes particulièrement redevables aux précurseurs de ces travaux que sont Christophe Robaglia (AMU), Alain Palloix, Carole Caranta et Olivier Le Gall, ainsi qu'à tous les étudiants, techniciens, ingénieurs et chercheurs de nos deux laboratoires qui ont été à l'origine de ces travaux. Étant donné le nombre très important de publications sur le sujet des résistances liées aux facteurs eIF4E, et les contraintes de place, nous nous excusons pour toute omission. Enfin, nous remercions la Société française de virologie pour l'invitation à communiquer nos résultats aux XXIII^{es} Journées francophones de virologie les 26 et 27 avril 2021 et l'échange franco-japonais PHC SAKURA dans le cadre duquel une grande partie de cette revue a été rédigée.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

¹ https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/fr/ip_21_1985 (consulté le 25 mars 2023).

² <https://www.bbc.com/news/science-environment-64596453> (consulté le 25 mars 2023).

Références

1. Nicaise V. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. *Front Plant Sci* 2014 ; 5 : 660.
2. German-Retana S, Pooggin MM, Gallois J-L, Ortiz D, Moury B. Comment les plantes se défendent-elles face aux virus ? In : *L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies*. Versailles : éditions Quae ; 2021.
3. de Oliveira LC, Volpon L, Rahardjo AK, Osborne MJ, Culjkovic-Kraljacic B, Trahan C, *et al*. Structural studies of the eIF4E–VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: Implications for translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019 ; 116 (48) : 24056-65.
4. Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* 2002 ; 12 (12) : 1046-51.
5. Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 2002 ; 32(6) : 927-34.
6. Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, Moury B, Bendahmane A, Robaglia C, *et al*. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* 2002 ; 32 : 1067-75.
7. Nicaise V, German-Retana S, Sanjuán R, Dubrana MP, Mazier M, Maisonneuve B, *et al*. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* 2003 ; 132 (3) : 1272-82.
8. Robaglia C, Caranta C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* 2006 ; 11 (1) : 40-5.
9. Nieto C, Morales M, Orjeda G, Clepet C, Monfort A, Sturbois B, *et al*. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J* 2006 ; 48 (3) : 452-462.
10. Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, *et al*. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J* 2005 ; 42 (6) : 912-922.
11. Julio E, Cotucheau J, Decors C, Volpatti R, Sentenac C, Candresse T, *et al*. A Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the “va” Tobacco Recessive Resistance to Potyviruses. *Plant Mol Biol Report* 2015 ; 33 : 609-623.
12. Charron C, Nicolaï M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, *et al*. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J* 2008 ; 54 (1) : 56-68.
13. Poulicard N, Pacios LF, Gallois JL, Piñero D, García-Arenal F. Human Management of a Wild Plant Modulates the Evolutionary Dynamics of a Gene Determining Recessive Resistance to Virus Infection. *PLoS Genet* 2016 ; 12 (8) : e1006214.
14. Tamisier L, Lacombe S, Caranta C, Gallois JL, Moury B. Virus Evolution Faced to Multiple Host Targets: The Potyvirus—Pepper Case Study. *Curr Top Microbiol Immunol* 2023 : 439 : 121-38.
15. Ruud KA, Kuhlow C, Goss DJ, Browning KS. Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 1998 ; 273 (17) : 10325-30.
16. Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M, Uyeda I. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett* 2005 ; 579 : 1167-71.
17. Nicaise V, Gallois JL, Chafiai F, Allen LM, Schurdi-Levraud V, Browning KS, *et al*. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 2007 ; 581 : 1041-6.
18. Gallois JL, Charron C, Sanchez F, Pagny G, Houvenaghel MC, Moretti A, *et al*. Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J Gen Virol* 2010 ; 91 : 288-293.
19. Callot C, Gallois JL. Pyramiding resistances based on translation initiation factors in *Arabidopsis* is impaired by male gametophyte lethality. *Plant Signal Behav* 2014 ; 9 (2) : e27940.
20. Ruffel S, Gallois JL, Lesage ML, Caranta C. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol Genet Genomics* 2005 ; 274 : 346-353.
21. Piron F, Nicolaï M, Minoïa S, Piednoir E, Moretti A, Salgues A, *et al*. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One* 2010 ; 5 (6) : e11313.
22. Gauffier C, Lebaron C, Moretti A, Constant C, Moquet F, Bonnet G, *et al*. A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy. *Plant J* 2016 ; 85 : 717-29.
23. Moury B, Lebaron C, Szadkowski M, Ben Khalifa M, Girardot G, Bolou Bi BA, *et al*. Knock-out mutation of eukaryotic initiation factor 4E2 (eIF4E2) confers resistance to pepper vein mottle virus in tomato. *Virology* 2020 ; 539 : 11-17.
24. Michel V, Julio E, Candresse T, Cotucheau J, Decors C, Volpatti R, *et al*. A complex eIF4E locus impacts the durability of va resistance to Potato virus Y in tobacco. *Mol Plant Pathol* 2019 ; 20 : 1051-66.
25. Bastet A, Robaglia C, Gallois JL. eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends Plant Sci* 2017 ; 22 : 411-9.
26. Mazier M, Flamain F, Nicolaï M, Sarnette V, Caranta C. Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS ONE* 2011 ; 6 (12) : e29595.
27. Schmitt-Keichinger C. Manipulating cellular factors to combat viruses: A case study from the plant eukaryotic translation initiation factors eIF4. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 17.
28. Pyott DE, Sheehan E, Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol Plant Pathol* 2016 ; 17 : 1276-88.
29. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, *et al*. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 2016 ; 17 : 1140-53.
30. Kuroiwa K, Thenault C, Nogué F, Perrot L, Mazier M, Gallois JL. CRISPR-based knock-out of eIF4E2 in a cherry tomato background successfully recapitulates resistance to pepper vein mottle virus. *Plant Sci* 2022 ; 316 : 111160.
31. Pechar GS, Donaire L, Gosalvez B, García-Almodovar C, Sánchez-Pina MA, Truniger V, *et al*. Editing melon eIF4E associates with virus resistance and male sterility. *Plant Biotechnol J* 2022 ; 20 : 2006-22.
32. Veillet F, Durand M, Kroj T, Cesari S, Gallois JL. Precision Breeding Made Real with CRISPR: Illustration through Genetic Resistance to Pathogens. *Plant Commun* 2020 ; 1 (5) : 100102.
33. Bastet A, Lederer B, Giovanazzo N, Arnoux X, German-Retana S, Reinbold C, *et al*. Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants. *Plant Biotechnol J* 2018 ; 16 : 1569-81.
34. Bastet A, Zafirov D, Giovanazzo N, Guyon-Debast A, Nogué F, Robaglia C, *et al*. Mimicking natural polymorphism in eIF4E by

CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant Biotechnol J* 2019 ; 17 : 1736-50.

- 35.** Kuroiwa K, Danilo B, Perrot L, Thenault C, Veillet F, Delacote F, *et al.* An iterative gene-editing strategy broadens eIF4E1 genetic diversity in *Solanum lycopersicum* and generates resistance to multiple potyvirus isolates. *Plant Biotechnol J* 2023 ; 21 (5) : 918-930.
- 36.** Eskelin K, Hafrén A, Rantalainen KI, Mäkinen K. Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA Translation In Planta. *J Virol* 2011 ; 85 : 9210-9221.
- 37.** Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, *et al.* Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep* 2005 ; 6 : 968-972.
- 38.** Lebaron C, Rosado A, Sauvage C, Gauffier C, German-Retana S, Moury B, *et al.* A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to potato virus Y in tomato albeit with a low durability. *J Gen Virol* 2016 ; 97 : 3063-3072.
- 39.** Anzalone A V, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019 ; 576 : 149-157.
- 40.** Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF. Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol* 2020 ; 38 : 84-89.
- 41.** Miras M, Allen Miller W, Truniger V, Aranda MA. Non-canonical translation in Plant RNA viruses. *Front Plant Sci* 2017 ; 8 : 494.
- 42.** Abdul-Razzak A, Guiraud T, Peypelut M, Walter J, Houvenaghel MC, Candresse T, *et al.* Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol Plant Pathol* 2009 ; 10 : 109-113.
- 43.** Sorel M, Svanella-Dumas L, Candresse T, Acelin G, Pitarch A, Houvenaghel MC, *et al.* Key mutations in the cylindrical inclusion involved in lettuce mosaic virus adaptation to eIF4E-mediated resistance in lettuce. *Mol Plant Microbe Interact* 2014 ; 27 : 1014-24.
- 44.** Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, *et al.* Protein disulfide isomerase like 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 ; 111 : 2104-09.
- 45.** Cheng C, Kan J, Li S, Jiang C, He X, Shen H, *et al.* Mutation of barley HvPDIL5-1 improves resistance to yellow mosaic virus disease without growth or yield penalties. *Front Plant Sci* 2022 ; 13 : 1018379.
- 46.** Kravchik M, Shnaider Y, Abebie B, Shtarkman M, Kumari R, Kumar S, *et al.* Knockout of SITOM1 and SITOM3 results in differential resistance to tobamovirus in tomato. *Mol Plant Pathol* 2022 ; 23 : 1278-89.
- 47.** Ishikawa M, Yoshida T, Matsuyama M, Kouzai Y, Kano A, Ishibashi K. Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of tobamovirus multiplication 1 in tomato. *Plant Physiol* 2022 ; 189 : 679-86.