UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414

Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS
UMR Santé de la vigne et Qualité du Vin, INRA de Colmar
Institut Français de la Vigne et du Vin

THÈSE CIFRE présentée par :

Léa ACKERER

soutenue le : **21 juin 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Les Nanobodies, un nouvel outil de diagnostic de la maladie du court-noué de la vigne

THÈSE dirigée par :

Dr Gérard Demangeat	Ingénieur de recherche, INRA de Colmar
Dr Christophe Ritzenthaler	Directeur de recherche, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr Cécile Desbiez	Chargée de recherche, INRA d'Avignon
Dr Thierry Candresse	Directeur de recherche, INRA de Bordeaux

EXAMINATEURS :

Dr Véronique Ziegler-Graff	Directeur de recherche, CNRS Strasbourg
Dr Jean-Sébastien Reynard	Ingénieur agronome, Agroscope de Changins

MEMBRE INVITÉ :

Dr Anne-Sophie Spilmont	Chef de projet, Institut de la Vigne et du Vin, le Grau du Roi

Remerciements

Je remercie les membres du jury, Cécile Desbiez, Thierry Candresse, Véronique Ziegler-Graff et Jean-Sébastien Reynard d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à mes deux directeurs de thèse, Christophe Ritzenthaler et Gérard Demangeat pour m'avoir permis de vivre cette expérience qu'est la thèse, sur un sujet appliqué aussi dynamique qu'intéressant, ainsi que pour leur enthousiasme et leur disponibilité tout au long de ces années.

Merci à l'Institut Français de la Vigne et du vin d'avoir accepté de financer mon doctorat, et particulièrement à Anne-Sophie Spilmont, Isabelle Beccavin et Laurent Audeguin pour leur accueil, leurs explications et leur disponibilité lors de mes séjours au Grau du Roi.

Merci à Serge Muyldermans qui nous a propulsé dans l'aventure Nanobodies et qui a partagé avec passion son savoir et ses idées pour les différents projets du laboratoire.

Merci à l'entreprise Bioreba pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de leur entreprise, et en particulier à Denise Altenbach et Christophe Debonneville pour leur enthousiasme, leur intérêt et leur réactivité concernant les tests Nanobodies.

Merci à tous les partenaires ayant participer à la résolution du complexe Nanobodies-virus, en particulier Bernard Lorber pour son aide lors des marathons de DLS, ses discussions et ses conseils, aussi bien scientifiques que personnels, à l'équipe de Bruno Klaholz et en particulier Igor Orlov pour son temps et ses explications lors des observations du complexe Nb-virus d'abord au microscope Polara puis au Titan Krios.

Merci à tous les collègues de l'équipe d'Olivier Lemaire à l'Inra de Colmar, en particulier Manue et Molly, pour m'avoir initiée aux purifications de virus, aux vendanges en parcelle sympto mais aussi pour toutes les discussions aussi bien professionnelles que personnelles qui ont parsemé mes séjours à l'Inra. Merci également à Sophie Gersch et Claude Gertz pour leur aide lors des prélèvements et des préparations d'échantillons (surtout pour les bois !) ainsi qu'à Monique Beuve et Aurélie Marmonier pour la caractérisation des isolats viraux de la parcelle népovirus. Merci à tous les autres membres de l'équipe, Olivier, Samia, Lorène, Peggy, Jean-François, Étienne, Isabelle pour leur accueil et pour les discussions en pause café.

Merci à tous mes collègues de l'IBMP, et plus particulièrement Nicolas Baumberger et Laurence Herrgott, pour m'avoir accueillie au sein de la plateforme de production de protéines, pour m'avoir formée à la purification et pour m'avoir permis d'occuper intensivement l'Akta Purifier même à des heures indues. Merci à tous les collègues du département de Virologie, en particulier Elodie, Alyssa, David, Danièle et Véronique pour les

discussions, les goûters et les apéros au 409. Merci à tous les collègues du premier étage, pour nous avoir accueilli à l'étage du département GenEX et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir au détour des couloirs, en particulier avec les membres du 326. Merci aux collègues du 309, Corinne, Ahmed, Vianney, François, Baptiste et surtout Kamal, pour leur aide, leur disponibilité et les discussions aussi bien scientifiques que personnelles. Merci aussi à Kinda pour sa gentillesse et ses douceurs culinaires déposées dans le box du 309.

Merci à Géraldine, Magali et Danièle pour m'avoir fait participer à la Newsletter de l'IBMP et m'avoir permis de rire et de respirer en dehors du laboratoire.

Merci à Jean-Luc et François pour leur aide logistique et informatique dans la bonne humeur, ainsi que pour leur disponibilité.

Merci à ma famille, qui m'a soutenue dans mes décisions professionnelles et personnelles, à mes parents pour leur disponibilité et leur aide, à ma petite sœur pour les discussions, les sorties et le visionnage de nos séries télé qui ont permis de m'aérer le cerveau.

Merci à mon parrain, qui m'a guidée lors de mes premiers pas dans le monde du GFLV de l'autre côté de l'Atlantique, et qui m'a donné de précieux conseils tout au long de ma thèse, et plus encore lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à tous mes amis qui ont contribués à me faire sourire ces dernières années et en particulier à mes amies globetrotteuses, Charlène, Valentine, Marianna et Laure pour avoir fait de ma thèse une aventure autre que scientifique. Merci aussi à Max et Flood pour nous avoir permis de souffler en nous accueillant dans leur adorable famille. Merci à mes grands-parents pour m'avoir hébergée et chouchoutée pendant toutes les semaines passées à l'INRA de Colmar, ainsi qu'à Jacqueline et Michel pour leur gentillesse, et pour m'avoir hébergée dans leur magnifique moulin lors de mes séjours à Reinach.

Enfin, un énorme merci à Cyrille, qui a réussi à me supporter depuis le stage de master 2, merci de m'avoir écoutée et encouragée tout au long de nos thèses mais surtout pour m'avoir redonné le sourire. Je crois que ce n'est plus un secret pour personne à l'IBMP…

Préface

La vigne est une plante pérenne sujette à de nombreuses attaques par des pathogènes tels que des bactéries, champignons ou virus. Plus de soixante-cinq virus infectant la vigne ont été décrits. Ils causent de lourdes pertes de récolte et diminuent la longévité des pieds de vigne, mettant en danger la productivité et la survie des parcelles viticoles. La maladie du court-noué de la vigne est présente dans la quasi-totalité des vignobles du monde et touche 60% du vignoble français. Cette virose entraîne des pertes de récoltes importantes et provoque des altérations de la qualité des moûts, incompatibles avec la production de vins de qualité. Seize virus dont quinze népovirus et le virus latent des taches annulaires du fraisier (*Strawberry latent ringspot virus* ; SLRSV) peuvent engendrer cette maladie, mais les principaux agents responsables sont le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et dans une moindre mesure le virus de l'arabette (*Arabis mosaic virus ;* ArMV), tous deux transmis par nématodes. Ces deux virus seront décrits plus en détails dans l'introduction de ce manuscrit. Malgré des progrès significatifs de la connaissance de cette maladie au cours de ces vingt dernières années, aucune ressource génétique montrant de la résistance à ces virus n'a été identifiée. Avec le retrait des molécules de synthèse nématicides, la viticulture est dépourvue d'itinéraire technique pour contrôler cette maladie et, en dehors de l'arrachage des vignes infectées suivi d'un repos du sol pluriannuel, le seul moyen permettant de contrôler la dispersion de ce virus repose sur la diffusion de matériel végétal sain. Cette sélection sanitaire consiste à certifier l'absence de virus par des méthodes sérologiques et/ou d'indexage, pratiquées sur les vignes commercialisées, importées et exportées. Différentes approches de diagnostic et de certification seront plus amplement décrites et comparées dans le deuxième chapitre d'introduction de ce manuscrit.

La certification sanitaire de la vigne est principalement basée sur le dépistage des népovirus par une technique sérologique, basée sur un sandwich d'anticorps (*Double Antibody Sandwich Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* ; DAS-ELISA). Ce test comporte quatre étapes et utilise deux réactifs immunologiques spécifiques du virus : un premier réactif permettant la capture des particules virales (réactif de *coating*) et le second, basés sur des anticorps conjugués à une enzyme (réactif conjugué), permettant le détection des particules capturées. Ces réactifs sont produits à partir d'anticorps purifiés issus d'animaux ou

d'hybridomes et leurs productions et purifications nécessitent des structures et des compétences très spécifiques. Les anticorps utilisés pour le DAS-ELISA actuel pourraient être avantageusement remplacés par des Nanobodies®. Un Nanobody (Nb) est le nom commercial d'un peptide d'environ 15 kDa correspondant au domaine hypervariable d'immunoglobulines mono-chaînes de camélidés (*HyperVariable domain of Heavy-chain-only antibody* ; VHH). Les Nb sont les plus petites protéines à activité de type anticorps connues et sont facilement manipulables par les techniques de génie génétique. Leurs caractéristiques et leurs utilisations actuelles seront décrites dans le troisième et dernier chapitre d'introduction. La spécificité des Nb, la facilité de modification des Nb sans altération de leur capacité de reconnaissance de l'antigène, leur production à moindre coût sont autant d'avantages qui font des Nb une alternative aux immunoglobulines conventionnelles utilisées dans les kits ELISA commerciaux. L'utilisation de Nb permettrait de s'affranchir des problèmes de variation de qualité et de spectre de reconnaissance des lots d'immunisation des anticorps polyclonaux, de la conservation de lignées d'hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux, mais surtout des infrastructures particulières et onéreuses inhérentes à ces techniques (animalerie, habilitations pour la manipulation animale, équipement de culture cellulaire, etc.. .), la production de Nb se faisant intégralement en bactéries *Escherichia coli*.

Les précédents travaux menés dans le cadre de la thèse de Caroline Hemmer dans les laboratoires de Christophe Ritzenthaler (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, IBMP, Strasbourg) et d'Olivier Lemaire (Inra de Colmar) ont conduit à identifier une collection de 23 Nb anti-GFLV, reconnaissant tous la souche de référence du GFLV, la souche F13. Plus récemment, 43 Nb anti-ArMV ont été identifiés par Baptiste Monsion, reconnaissant tous la souche de référence de l'ArMV, la souche S. Les protéines de capside des différents variants viraux de l'ArMV et du GFLV présentant des similarités de séquence et de structure, il était concevable que les Nb identifiés puissent présenter un large spectre de réactivité contre les virus du court-noué de la vigne. L'ensemble des résultats est présenté dans le chapitre 4 pour les Nb anti-GFLV et dans le chapitre 5 pour les Nb anti-ArMV.

L'objectif de ma thèse était de développer des tests de détection du GFLV et de l'ArMV basés intégralement sur des Nb. J'ai évalué en premier lieu le spectre de reconnaissance des différents Nb anti-GFLV et anti-ArMV en se basant sur les collections de vignes infectées par l'ArMV et le GFLV de l'Inra de Colmar, de l'Institut Français de la Vigne et du vin (IFV, Grau du Roi, France) et de Bioreba AG (Reinach, Suisse). J'ai ainsi pu montrer que 3 Nb anti-GFLV de notre collection sont suffisants pour détecter l'ensemble des isolats de GFLV de ces collections et que 3 Nb anti-ArMV différents peuvent chacun détecter tous les isolats d'ArMV testés de la collection de l'Inra de Colmar. Ces criblages ont servi de base pour identifier les Nb au spectre le plus large, condition indispensable au développement d'un test de diagnostic fiable. Dans un deuxième temps, j'ai adapté les Nb pour en faire des réactifs de capture (*coating*) faciles à produire dans *E. coli* et n'engendrant pas de perte ou d'altération de reconnaissance de l'antigène suite à l'adsorption sur la plaque ELISA. Ainsi, le potentiel de trois protéines de fusion et de deux peptides de liaison (*linker)* différents a été évalué, ce qui a permis de démontrer que les Chromobodies® (Cb), issus de la fusion d'un Nb avec une protéine fluorescente, sont adaptés à l'étape de *coating*. Le troisième volet de mes travaux a porté sur l'étape de détection du test. Dans la majorité des kits de détection de type DAS-ELISA, l'étape de détection est effectuée grâce à des anticorps couplés chimiquement à une enzyme. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions des tests commerciaux existants et de s'aligner sur le nombre d'étape du DAS-ELISA conventionnel, j'ai validé la fonctionnalité de Nb couplés ou fusionnés à la phosphatase alcaline (PAL). Ceci m'a permis de conclure que la fusion directe des Nb à une PAL bactérienne est l'approche la plus pertinente.

Forte de ces résultats exploratoires, il me restait à démontrer l'efficacité du DAS-ELISA à base de Nb par rapport à un kit commercial, en l'occurrence le test anti-GFLV de l'entreprise Bioreba, ce kit de référence le plus performant du marché étant utilisé en routine à l'Inra de Colmar et à l'IFV. Pour cela, il convenait de s'assurer non seulement du spectre de reconnaissance et de la sensibilité du test Nb, mais aussi de sa capacité à répéter de façon cohérente le même test, à l'aide des mêmes réactifs, dans les mêmes conditions (critère de **répétabilité**) et de la capacité des réactifs, utilisés par plusieurs opérateurs, à reproduire de façon cohérente le même test, dans les mêmes conditions (critère de **reproductibilité**). Mes résultats attestent de la supériorité des Nb par rapport aux réactifs anti-GFLV et anti-ArMV

commercialisés par l'entreprise Bioreba, ouvrant des perspectives commerciales à mon travail de thèse.

En parallèle à mon implication dans l'élaboration d'un DAS-ELISA composé de Nb, j'ai caractérisé les épitopes reconnus par certains Nb anti-GFLV ainsi que leur occurrence à la surface de la capside virale. D'une part, l'analyse de la reconnaissance des collections de vignes infectées par les Nb anti-GFLV montre que les Nb de la famille majoritaire présentent le plus large spectre de reconnaissance. D'autre part, l'un des Nb de cette famille majoritaire, le Nb 23, exprimé de manière constitutive chez le tabac *Nicotiana benthamiana,* confère une résistance à au moins 8 isolats différents de GFLV (Hemmer *et al*., 2016). Ces résultats m'ont amenée à caractériser l'épitope reconnu par ce Nb dont le processus est décrit dans le chapitre 6 de ce manuscrit. Des analyses effectives par diffusion de lumière (*Dynamic light scattering* ; DLS), m'ont permis d'établir les conditions optimales nécessaires à la formation et l'observation du complexe Nb 23/GFLV-F13 monomodal et monodisperse, ouvrant ainsi la voie à des essais de cristallisation et à l'analyse du complexe par cryomicroscopie électronique. Ceci a conduit à la caractérisation fine de l'épitope reconnu par ce Nb. En vue d'identifier les différents épitopes reconnus par notre collection de Nb anti-GFLV sans avoir recours à des approches structurales, j'ai opté pour une approche de modélisation moléculaire *in silico* de complexe Nb/virus. N'ayant pas pu obtenir de résultats *in silico* concluants, l'identification d'épitopes reconnus par les Nb a été réalisée suite à l'analyse de données biologiques. Des expériences d'ELISA compétitifs ont alors été menées afin d'identifier des Nb pouvant reconnaître un épitope commun. Puis, la comparaison entre les spectres de reconnaissance de différents Nb et l'alignement de séquences de protéines CP d'isolats de GFLV caractérisés à la recherche de résidus divergents, pouvant expliquer la perte ou la diminution de reconnaissance de l'isolat par les Nb, ont permis d'identifier les potentiels épitopes reconnus par trois autres Nb, les Nb p59, 155 et 122.

Table des matières

Abréviations 1

Chapitre I. La maladie du court-noué de la vigne 5

I. Les viroses majeures de la vigne 7
1. La maladie de l'enroulement 7
2. Le complexe du bois strié (*rugose wood complex*) 11
3. Le complexe de la marbrure (*fleck complex*) 13
4. La maladie du court-noué de la vigne 13

II. Historique de la maladie du court-noué 15

III. Cycle de la vigne et symptomatologie de la maladie du court-noué 19

IV. Impact agronomique et économique de la maladie du court-noué 23

V. Etiologie 25

VI. Cycle de multiplication du *Grapevine fanleaf virus* 27
1. Structure et expression du génome viral 27
2. Variabilité génétique 32
3. Réplication 35
4. Transmission 35
A. Transmission par les nématodes vecteurs 35
B. Autres modes de transmission 41
C. Gamme d'hôtes 42

VII. Gestion et lutte contre la maladie 42
1. Cas d'un vignoble infecté 42
A. Pratiques culturales et lutte contre le nématode vecteur 42
B. La lutte biologique 43
C. La prémunition 44
D. Le phénomène de résistance 44
E. Stratégies curatives à partir d'une plante infectée 47
2. Cas d'un vignoble sain 49
A. La sélection clonale 49
B. La sélection sanitaire 50

Chapitre II. Diagnostic des maladies à virus de la vigne 53

I. Les méthodes biologiques 57
1. Observations des symptômes 57
2. Indexage biologique 59
3. Inoculation mécanique de plantes herbacées 61

II. Observations par microscopie 61
1. Microscopie optique 61
2. Microscopie électronique 63

III. Les méthodes moléculaires 63
1. Hybridation moléculaire 65
2. Les méthodes dérivées de la PCR 65
A. La RT-PCR 65
B. La nested-PCR 67
C. L' ImmunoCapture Reverse Transcription PCR 67
D. L'analyse RFLP 69

E. La real time quantitative RT-PCR (rt RT-qPCR) 69
3. Les techniques de détection multiple 73
A. La RT-PCR multiplex 73
B. L'approche de Low Density Array (LDA) 73
C. Microarrays et macroarrays 75
D. Next Generation Sequencing (NGS) 75
IV. Les méthodes sérologiques 79
1. Les anticorps polyclonaux et monoclonaux 79
2. Immunodiffusion et précipitation en milieu gélifié 83
3. Test d'agglutination 85
4. Le test de diagnostic ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) 85
5. Les kits de détection Immunochromatographie 87
6. Détection par Immunofiltration 87
7. Évolution des anticorps 90
V. Comparaison des méthodes de diagnostic actuelles 91

Chapitre III. Les Nanobodies 99

I. Les anticorps à chaînes lourdes 101
1. Découverte 101
2. Structure 103
III. Les Nanobodies 105
1. Structure 105
2. Obtention et production de Nanobodies 107
3. Propriétés et avantages 110
III. Applications des Nanobodies 111
1. Thérapeutique 111
2. Imagerie 114
3. Chaperonnes 115
4. Modulation de cibles 116
5. Environnement et agroalimentaire 117
6. Diagnostic 117
A. Diagnostic viral et phytodiagnostic 119

Chapitre IV. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic du *Grapevine fanleaf virus* 121

I. Évaluation de la capacité de reconnaissance du GFLV par les Nb 123
1. Étiquetage et production des Nb anti-GFLV 123
2. Caractérisation des Nb étiquetés produits 127
A. Reconnaissance de la souche de référence, le GFLV-F13 127
B. Caractérisation du spectre des Nb contre les collections de vignes infectées 129
II. Développement des Nb comme réactifs de coating 137
1. Clonage et Production des Nb-P 139
2. Comparaison des *linker* 3GS3G et StrepTagII 141
3. Analyse de la fonctionnalité des Nb-P pour la capture des particules virales. 143
4. Optimisation des conditions d'utilisation des Cb 145
III. Évaluation du test complet Nb 147
IV. Optimisation de l'étape de détection et de révélation du test Nb 149
1. Réduction du nombre d'étapes de détection du test Nb 149
A. Couplage chimique des Nb à la PAL 149
B. Fusion génétique des Nb à la phosphatase alcaline 155

a. Clonage et production des Nb-PAL 155
b. Optimisation de la production des Nb-PAL 157
2. Optimisation du tampon conjugué 161
3. Optimisation du tampon substrat 163
V. Évaluation des Nb-PAL en tant que réactifs de détection 165
VI. Élaboration d'un test complet Nb DAS-ELISA anti-GFLV 167
1. Comparaison du test complet Nb et du test Bioreba sur des échantillons de feuilles et de bois de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar 169
2. Reproductibilité du test ELISA Nb 171
A. Expériences menées à l'entreprise Bioreba (Reinach, Suisse) 171
B. Expériences menées à l'Institut Français de la Vigne et du Vin (Grau du Roi) 173
3. Sensibilité et seuil de détection du GFLV en DAS-ELISA 173

Chapitre V. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic contre l'*Arabis mosaic virus* *177*

I. Recherche de Nb anti-ArMV parmi les Nb anti-GFLV 179
II. Caractérisation des Nb anti-ArMV 181
1. Sélection des Nb anti-ArMV d'intérêt par PE-DAS-ELISA 181
2. Clonage et production de Nb anti-ArMV 187
3. Caractérisation des Nb-anti ArMV 189
4. Recherche de Nb anti-ArMV capables de détecter les isolats Z. P116 N et Z. P120 par PE-DAS-ELISA 191
5. Optimisation de la purification des Nb anti-ArMV 191
6. Caractérisation des Nb anti-ArMV purifiés à homogénéité 195
III. Développement des réactifs DAS-ELISA Nb anti-ArMV 197
IV. Évaluation du test complet Nb anti-ArMV 199
V. Caractérisation des isolats Chardonnay H138 et T62 201
VI. L'énigme du Nb anti-ArMV 3082 203

Chapitre VI. Structure et modélisation de complexes Nb-virus 209

I. Observation et caractérisation du complexe Nb 23/GFLV-F13 211
1. Recherche des conditions optimales de la formation du complexe Nb/GFLV 215
II. Essais de cristallisation du complexe Nb 23/GFLV-F13 217
III. Résolution de la structure du complexe Nb 23/GFLV-F13 219
IV. Analyses bioinformatiques 223
1. Modélisation de la structure 3D des Nb 223
2. *Docking* des Nb sur le pentamère de la protéine de capside du GFLV-F13 225
V. Identification d'épitopes reconnus par les Nb par analyse de données biologiques 231
1. Tests ELISA compétitifs contre le GFLV-F13 purifié 233
2. Identification d'épitopes grâce à l'analyse du spectre de reconnaissance des Nb et à la comparaison de séquence de la protéine de capside d'isolats de GFLV 235
A. Épitope reconnu par les Nb 23 et p75 235
B. Épitope reconnu par le Nb 122 237
C. Épitope reconnu par les Nb p59, 155 et 125 237
a. Nb p59 237
b. Nb 155 239
c. Le Nb 125 241

Discussion et perspectives 265

Matériel et Méthodes 275

I. Matériel 277

1. Plasmides 277
A. pDonRZeo 277
B. p0Gwa modifié 277
C. pET22b(+) 277
2. Souches bactériennes 279
A. Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen) 279
B. BL21(DE3) (Novagen) 279
C. SHuffle T7 Express E.coli (Biolabs) 279
D. Bactéries TG1 279
3. Milieux de culture 280
A. Milieu LB (Luria Bertani) 280
B. Milieu NZY 280
C. Milieu TB (Terrific Broth) 280
4. Plantes hôtes 281
A. Chenopodium quinoa 281
B. Vitis vinifera 281
C. Nicotiana benthamiana 281
5. ELISA 281
6. Dynamic light scattering 283
7. Cristallographie 283
8. Outils informatiques 283

II. Méthodes 283

1. Clonage des Nanobodies 283
A. La technologie Gateway 283
B. Conception des oligonucléotides et PCR 285
C. Recombinaison BP et LR 285
D. Clonage des Cb, Nb-GST et des Nb-PAL par digestion/ligation 286
E. Transformation des bactéries 286
F. Criblage des colonies par PCR 287
G. Extraction et purification des ADN plasmidiques 287
H. Identification des clones recombinants 287
2. Expression et production des Nanobodies 287
A. En bactéries BL21 et milieu NZY 287
B. En bactéries SHuffle et milieu TB 288
3. Extraction des Nanobodies 288
A. Extraction périplasmique 288
B. Extraction cytoplasmique 288
4. Purification par chromatographie d'affinité (IMAC) 289
A. Purification sur colonne HisTrap 289
B. Purification sur colonne StrepTrap 289
5. Chromatographie d'exclusion stérique (gel filtration) 289
6. Dialyse des Nb-PAL 290
7. Contrôle de l'expression des Nanobodies 290
A. Préparation de l'échantillon 290
B. Séparation des protéines par électrophorèse en gel dénaturant Tris-Tricine 290
C. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) 291
D. Coloration des protéines après migration 291
8. Test ELISA 291
A. Coating direct de virus purifiés 291
B. Coating des anticorps polyclonaux 291
C. Coating des Chromobodies 292
D. Lavages des puits ELISA 292
E. Préparation des échantillons 292
F. Détection par les anticorps commerciaux 292

G. Détection par les Nb-6HisST 293
H. Détection par les Nb-PAL 293
I. Révélation du test ELISA 293
9. Criblage des Nb anti-ArMV par PE-ELISA 294
A. Préparation des extraits périplasmiques 294
B. Test PE-ELISA 294
10. Purifications de virus 294
11. Analyses statistiques 296
12. Expériences de *Dynamic light scattering* (DLS) 296
A. Effet du pH sur la capside virale 296
B. Titration du GFLV par les Nanobodies 296
13. Cryo-électromicroscopie 297

Annexes 299

Références Bibliographiques 353

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANR	Agence nationale de la recherche
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOP	Appellation d'origine protégée
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNsat	ARN satellite
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA	*Bovine serum albumine*
Cb	Chromobody
CDR	*Complementarity Determinig Region*
CEE	Communauté économique européene
CH	domaine constant de la chaine lourde d'IgG
ChIP	*Chromatin immunoprecipitation*
CL	domaine constant de la chaine légère d'IgG
COFRAC	Comité français d'accréditation
CP	protéine de capside (capsid or coat protein)
cryo-EM	cryo-microscopie électronique
CTPS	Comité Technique Permanent de Sélection
DAS-ELISA	*Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
DsbC	*Disulfide bond isomerase C*
dsRNA	*double stranded RNA*
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein*
Fab	*Fragment antigen binding*
Fc	*Fragment constant, crystallizable*
FR	*Framework Region*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
HA	hémagglutinine
HCAb	*Heavy Chain only antibody*
HER2	*Human epidermal growth factor receptor 2*
HP	*Homing protein*
HRP	*Horseradish peroxidase*
IBMC	Insitut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IBMP	Institut de Biologie Moléculaire des plantes
IC-RT-PCR	ImmunoCapture RetroTranscription PCR
IFV	Institut Français de la Vigne et du vin
IGBMC	Institut Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire
IgG	Immunoglobuline G
IgNAR	*Immunoglobuline New antigen receptor*
IgW	Immunoglobuline W
IMAC	*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*

INRA	Institut de recherche agronomique
ISEM	*ImmunoSorbent Electron Microscopy*
kDa	kilo Dalton
LDA	*Low Density Array*
M-RT-PCR	*Multiplex Reverse Transcription PCR*
MET	microscope électronique à transmission
MP	*Mouvement protein*
Nb	Nanobody
NBP	*Nematode binding pocket*
NGS	*Next Generation Sequencing*
PAL	Phosphatase Alcaline
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PDLP	*Plasmodesmata located protein*
PE-DAS-ELISA	*Periplasmique Extract Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
PE-ELISA	*Periplasmique Extract- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
PET-SCAN	Tomographie par Émission de Positron
QTL	*Quantitatif trait locus*
RE	réticulum endoplasmique
RFLP	*Restriction Fragment Length Polymorphism*
RIVEM	*Radial Interpretation of virus Electron-density Map*
rt qRT-PCR	*real time RT-PCR quantitative*
RT-PCR	*Reverse Transcription PCR*
scFv	*single chain variable Fragment*
SdAb	*single domaine Antibody*
SDS-PAGE	*SDS denaturing Polyacrilamide Gel Electrophoresis*
SEC	*Size exclusion Chromatography*
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA	*small interfering RNA*
ssRNA	*single stranded RNA*
ST	strepTag
TagRFP ou TR	*Tag Red Fluorescent protein*
TNT	trinitrotoluène
US FDA	*United States Food and Drug Administration*
UTR	*untranslated region*
V-NAR	*New Antigen Receptor Variable domain*
VH	domaine variable de la chaine lourde d'IgG
VHH	domaine variable d'HCAb
VIB	Vlaams Institute voor Biotechnologie (Brussels)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VL	domaine variable de la chaine légère d'IgG
VLP	*Virus-like particles*
VPg	*viral genome-linked protein*
VUB	Vrije Universiteit Brussel

Acronyme des virus

ArMV	*Arabis Mosaic virus*
GAMaV	*Grapevine asteroid mosaic virus*
Gdef	*Grapevine deformation virus*
GFkV	*Grapevine fleck virus*
GFLV	*Grapevine Fanleaf Virus*
GLRaV	*Grapevine Leafroll associated virus*
GPGV	*Grapevine pinot gris virus*
GRGV	*Grapvine Redglobe virus*
GV	*Grapevine virus*
RpRSV	*Raspberry ringspot virus*
SLRSV	*Strawberry latent ringspot virus*
TBRV	*Tomato black ring virus*
ToRSV	*Tomato ringspot virus*
TRSV	*Tobacco ringspot virus*
TuVX	*Tulip virus X*

Codes à une lettre et à trois lettres des acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	acide Aspartique
E	Glu	acide Glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Clycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Introduction

Chapitre I. La maladie du court-noué de la vigne

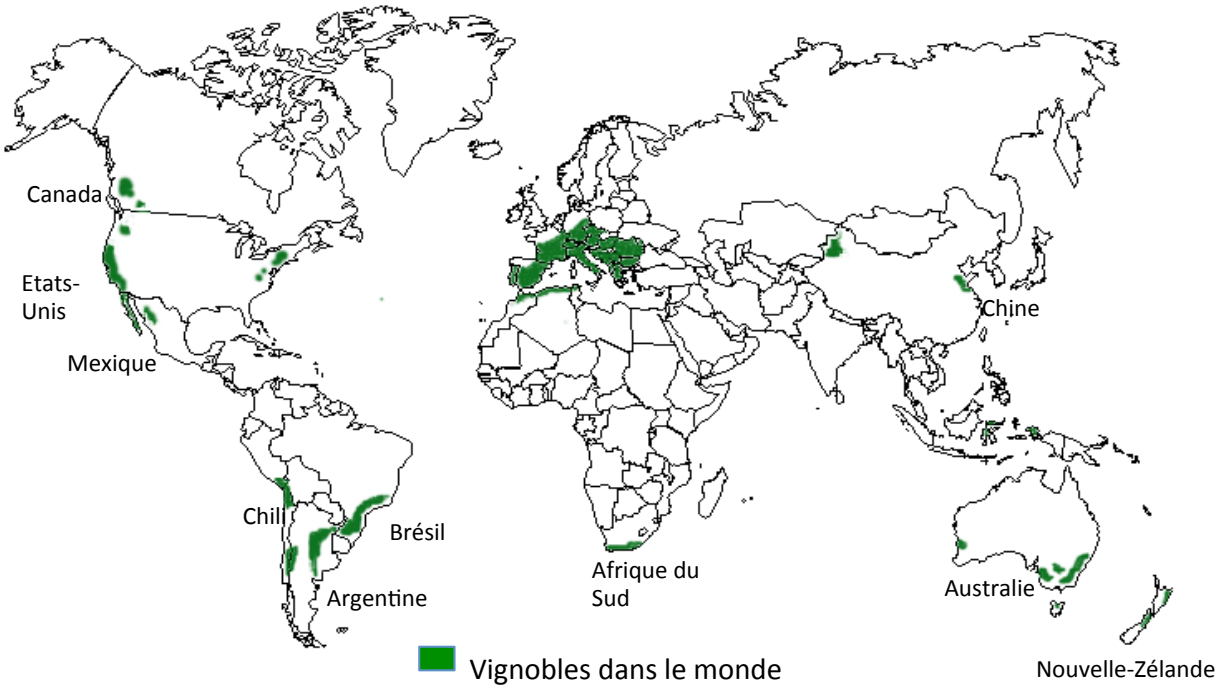
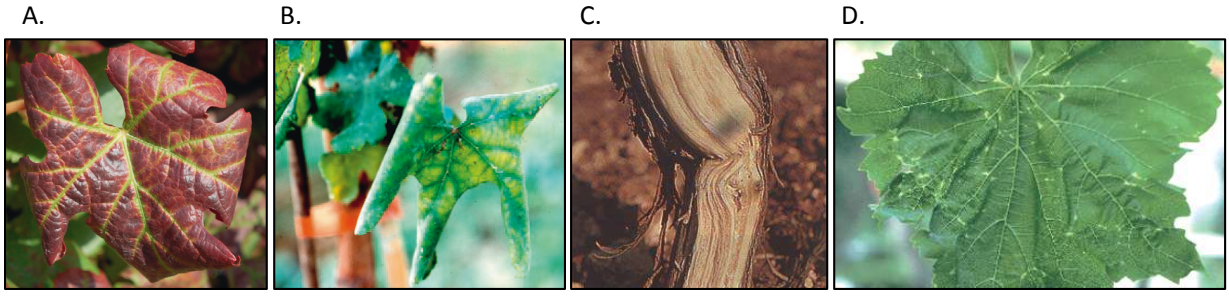


Figure 1.1. Implantation des vignobles majeurs dans le monde. La surface totale occupée par la viticulture est d'environ 7,5 millions d'hectares (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2013).



Maliogka, Martelli, Fuchs et Katis, 2015

Martelli et Boudon-Padieu, 2006

Figure 1.2. Photographie de symptômes sur vigne causés par les virus de l'enroulement (A et B), les virus du complexe du bois strié (C) et les virus de la marbrure (D). Les virus de l'enroulement causent une coloration rouge des feuilles sur cépages rouge **(A)** et jaune sur cépage blanc **(B)**. Les virus du complexe du bois strié sont responsables de stries, de cannelures et d'une déformation au niveau du point de greffe. Les virus de la marbrure (ici marbrure étoilée) sont responsables de la décoloration des veines, de tâches chlorotiques jaunes et d'une déformation de la feuille.

Chapitre I. La maladie du court-noué de la vigne

La vigne a été domestiquée par l'Homme vers 4000 avant Jésus-Christ dans la région du Caucase et est arrivée en France aux environs de 500 avant Jésus-Christ (Terral *et al.,* 2010). La majorité des vignes cultivées aujourd'hui appartient au genre *Vitis* et au sous genre *Euvitis* qui comporte trois sous-groupes d'origine géographique différente : américaine, asiatique et euro-asiatique. Le groupe euro-asiatique comprend une espèce unique, *Vitis vinifera,* qui comporte des milliers de cépages. Depuis l'épidémie de phylloxéra qui a décimé les vignobles à la fin du XIX^{ème} siècle, la quasi-totalité des vignes cultivées dans le monde sont issues de greffage pour lesquels la partie aérienne (greffon) correspond au cépage et la partie souterraine (porte-greffe) d'origine américaine (ou résultant d'un croisement avec une espèce américaine) confère la résistance ou la tolérance à ce puceron ravageur. Les vignobles actuels s'étendent sur 7,5 millions d'hectares dans le monde dont 780 milliers d'hectares en France (Vivier et Pretorius, 2000 ; figure 1.1). Les raisins sont majoritairement destinés à la production de vin mais également à la consommation directe ou à la fabrication de produits transformés tels que le jus de raisin, le vinaigre, l'huile ou les cosmétiques.

La vigne est une plante pérenne sujette à de nombreuses attaques par des pathogènes (bactéries, champignons, phytoplasmes, virus) et des ravageurs. Plus de 65 virus infectant la vigne ont été décrits (Tableau 1.1 ; Martelli, 2014). Ils peuvent causer de lourdes pertes de récolte et diminuer la longévité des pieds de vigne, compromettant gravement la productivité et la survie même de certains vignobles, notamment les vignobles historiques à haute valeur ajoutée.

I. Les viroses majeures de la vigne

1. La maladie de l'enroulement

La maladie de l'enroulement est une des maladies virales la plus répandue dans le monde (Martelli et Boudon-Pardieu, 2006 ; Martelli, 2014). Elle se traduit par un enroulement des feuilles vers le bas ainsi qu'une coloration des limbes tirant sur le rouge pour les cépages rouges, ou sur le jaune pour les cépages blancs, à l'exception des nervures qui restent vertes (figure 1.2. A et B). Ces symptômes apparaissent généralement à la base de la végétation à la

Famille	Genre	Espèce
Virus à ADN simple brin		
GEMINIVIRIDAE	Indéterminé	*Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV)
Virus à ADN double brin		
CAULIMOVIRIDAE	*Badnavirus*	*Grapevine vein clearing virus (GVCV)* *Grapevine leaf discoloration-associated virus (GRLDaV)*
Virus à ARN double brin		
REOVIRIDAE	*Oryzavirus*	*Virus non nommé*
ENDORNAVIRIDAE	*Endornavirus*	*Two unnamed viruses*
PARTITIVIRIDAE	*Alphacryptovirus*	*Raphanus sativus cryptic virus 3 (RsCV-3) like* *Beet cryptic virus 3 (BCV-3) like*
Virus à ARN simple brin de polarité négative		
BUNYAVIRIDAE	*Tospovirus*	*Tomato spotted wilt virus (TSWV)*
Virus à ARN simple brin de polarité positive (particules virales filamenteuses)		
CLOSTEROVIRIDAE	*Closterovirus*	*Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)*
	Ampelovirus	*Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)* *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)* *Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4)* *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5) *Grapevine leafroll-associated virus 6* (GLRaV-6) *Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)*
	Velarivirus	
ALPHAFLEXIVIRIDAE	*Potexvirus*	*Potato virus X (PVX)*
BETAFLEXIVIRIDAE	*Foveavirus*	*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)*
	Trichovirus	*Grapevine berry inner necrosis virus (GINV)* *Grapevine Pinot gris virus (GPGV)*
	Vitivirus	*Grapevine virus A (GVA)* *Grapevine virus B (GVB)* *Grapevine virus D (GVD)* *Grapevine virus E (GVE)* *Grapevine virus F (GVF)*
POTYVIRIDAE	*Potyvirus*	*Potyvirus-like virus isolé au Japon* *Bean common mosaic virus (BCMV)*
Virus à ARN simple brin de polarité positive (particules virales en bâtonnet)		
VIRGAVIRIDAE	*Tobamovirus*	*Tobacco mosaic virus (TMV)* *Tomato mosaic virus (ToMV)*

fin de l'été puis gagnent l'ensemble du feuillage au début de l'automne. Cette maladie est causée par des virus filamenteux de la famille des *Closteroviridae*, dénommés *Grapevine Leafroll-associated viruses* (GLRaV) et classés en 5 espèces, 1, 2, 3, 4 et 7 (Martelli, 2012). Les espèces 1, 3 et 4 appartiennent au genre *Ampelovirus,* l'espèce 2 au genre *Closterovirus* et l'espèce 7 au genre *Velarivirus*. Le GLRaV-3 est l'espèce la plus répandue (Maree *et al*., 2013) et le GLRaV-2 est impliqué dans des cas sévères d'incompatibilité de greffage sur certains porte-greffes dont le 5BB majoritairement (Uyemoto *et al*., 2001). Les virus de l'enroulement sont transmis par des cochenilles mais également par le greffage et la propagation de matériel infecté (Martelli, 2014). Ils provoquent un dysfonctionnement du transport phloémien qui conduit à l'affaiblissement des ceps et à un retard de maturation des baies, réduisant leur teneur en sucres (Habili et Monis, 2006). Ceci conduit également à une diminution du rendement de production des fruits de 15 à 20% (Martelli et Poudon-Padieu, 2006 ; Martelli, 2014). Les porte-greffes infectés ne montrent pas de symptômes foliaires mais présentent une perte de vigueur (Martelli et Boudon-Padieu, 2006 ; Martelli, 2014). La lutte contre la maladie s'appuie sur différentes stratégies qui incluent l'arrachage des ceps infectés après dévitalisation suivi d'une période de jachère, la plantation de matériel certifié sain, l'application d'insecticides et le brûlage des bois de taille pour éliminer les cochenilles larvaires et adultes, ainsi que l'utilisation de plantes brise-vent pour limiter la propagation aérienne des cochenilles vectrices (Pietersen *et al.,* 2013). La mise en application de ces stratégies a permis de diminuer l'incidence du GLRaV-3 dans un vignoble commercial sud-africain de 100% d'infection sur 111 431 vignes à 0.027% d'infection sur 209 626 ceps de vigne. Néanmoins, la présence de parcelles contaminées à proximité de parcelles saines nouvellement plantées favorise la contamination par le GLRaV-3 *via* la cochenille *Phenacoccus ascaris* (Le Maguet *et al.,* 2013). L'utilisation d'insecticides peut être remplacée par des moyens de lutte biologique, notamment l'utilisation de parasitoïdes et de prédateurs, qui régulent la population de certaines espèces de cochenilles (Daane *et al.,* 2006 ; Sentenac*,* 2012). Cependant, ces moyens de lutte biologique permettent uniquement de diminuer la population de cochenilles et n'ont aucun effet direct sur la transmission de la maladie dans un vignoble virosé. Aucune résistance naturelle de la vigne à ces virus pas plus qu'à tout autre virus de la vigne n'a été identifiée (Lahogue et Boulard, 1996 ; Martelli et Boudon-Padieu, 2006 ; Oliver et Fuchs, 2011). La commercialisation et l'implantation au vignoble de plants certifiés sains sont pour le moment le seul moyen de limiter la dispersion de la maladie.

Famille	Genre	Espèce
Virus à ARN simple brin de polarité positive (particules virales icosaédriques)		
SECOVIRIDAE	*Fabavirus*	*Broadbean wilt virus (BBWV)*
	Nepovirus	*Artichoke italian latent virus (AILV)*
		Arabis mosaic virus (ArMV)
		Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)
		Cherry leafroll virus (CLRV)
		Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)
		Grapevine Anatolian ringspot virus (GARSV)
		Grapevine deformation virus (GDefV)
		Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)
		Grapevine fanleaf virus (GFLV)
		Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)
		Peach rosette mosaic virus (PRMV)
		Raspberry ringspot virus (RpRSV)
		Tobacco ringspot virus (TRSV)
		Tomato ringspot virus (ToRSV)
		Tomato blackring virus TBRV)
	Indéterminé	*Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)*
BROMOVIRIDAE	*Alfamovirus*	*Alfalfa mosaic virus (AMV)*
	Cucumovirus	*Cucumber mosaic virus (CMV)*
	Ilarvirus	*Grapevine line pattern virus (GLPV)*
		Grapevine angular mosaic virus (GAMoV)
TOMBUSVIRIDAE	*Carmovirus*	*Carnation mottle virus (CarMV)*
	Necrovirus	*Tobacco necrosis virus D (TNV-D)*
	Tombusvirus	*Grapevine Algerian latent virus (GALV)*
		Petunia asteroid mosaic virus (PAMV)
		Grapevine asteroid mosaic-associated
TYMOVIRIDAE	*Marafivirus*	*virus (GAMaV)*
		Grapevine redglobe virus (GRGV)
		Grapevine Syrah virus 1 (GSV-1)
		Blackberry virus S (BlVS)
		Putatif marafivirus-like virus
	Maculavirus	*Grapevine fleck virus (GFkV)*
		Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV)
Virus non assignés à des familles		
	Idaeovirus	*Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)*
	Sobemovirus	*Sowbane mosaic virus (SoMV)*
Virus non classés		
		Unnamed filamentous virus
		Grapevine Ajinashika virus (GAgV)
		Grapevine stunt virus (GSV)
		Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)
		Southern tomato virus (STV)

Tableau 1.1 Taxonomie des virus infectant la vigne, classés par genre, famille et espèce. Plus de 60 virus différents infectant la vigne ont été identifiés à ce jour (d'après Martelli, 2014).

2. Le complexe du bois strié (*rugose wood complex*)

Le complexe du bois strié regroupe quatre types de syndromes, le *Rupestris stemp pitting*, le *Kober stem grooving*, le *corky bark* et le *LN33 stem grooving*. Les virus responsables de ces syndromes sont à l'état latent dans les plants de *Vitis vinifera* et leur présence se traduit par l'apparition de symptômes après greffage sur des variétés indicatrices sensibles. Les symptômes se traduisent par un rougissement des feuilles et un gonflement internodal ainsi que des striures et des cannelures au niveau des bois du greffon et/ou du porte-greffe (figure 1.2.C). Ces striures rendent les bois plus sensibles aux accidents climatiques, notamment aux gelées et au stress hydrique. Les virus du complexe du bois strié induisent une perte de vigueur, un sévère retard de croissance, une réduction de la taille voire un dépérissement du pied de vigne quelques années après la plantation. Ces symptômes sont causés par des virus filamenteux appartenant à la famille des *Betaflexiviridae*. Les *Grapevine virus A, B, D, E* et *F* (GVA, GVB, GVD, GVE et GVF) appartiennent au genre *Vitivirus* et le *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) au genre *Foveavirus.* Ces virus sont associés aux différents syndromes du complexe du bois strié. Le GRSPaV est associé au *Rupestris stem pitting* (Zhang *et al.,* 1998), le GVA à celui du *Kober stem grooving* (Chevalier *et al.,* 1995) et le GVB à celui du *corky bark* (Bonavia et *al*., 1996). Le GVD est associé aux deux syndromes causés par le GVA et le GVB. Le GVE a été isolé de vignes japonaises dont l'une montrait des symptômes de *stem pitting* (Nakaune *et al.,* 2008). Cependant, aucune relation directe entre ce virus et le syndrome du *Rupestris stem pitting* n'a été clairement établie jusqu'à présent (Martelli, 2014). Le GVF engendre des incompatibilités de greffage de Cabernet-Sauvignon sur différents porte-greffes mais n'a pour le moment pas été relié à un des syndromes de la maladie du bois strié (Martelli, 2014).

Ces virus sont transmis par des cochenilles et surtout par greffage et propagation de matériel infecté. La transmission simultanée du GVA, GVB et GVE et du GLRaV-1 et/ou du GLRaV-3 suggère que la transmission de ces trois vitivirus est assistée par les virus de l'enroulement (Hommay *et al.,* 2008 ; Martelli, 2014) mais d'autres publications montrent que la transmission du GVA et du GVB en l'absence de GLRaVs est possible (Agran *et al.,* 1990; Gribaudo *et al.,* 2009). Comme détaillées précédemment, les mesures de lutte contre les cochenilles vectrices sont peu efficaces et aucune résistance naturelle de la vigne à ces virus n'a été identifiée à ce jour (Martelli et Boudon-Padieu 2006 ; Oliver et Fuchs, 2011). L'utilisation de porte-greffes et greffons certifiés exempts de ces virus est d'une importance primordiale pour éviter la contamination des vignobles.

3. Le complexe de la marbrure (*fleck complex*)

Le complexe de la marbrure regroupe différents syndromes comme la marbrure (*grapevine fleck)*, la mosaïque étoilée (*grapevine asteroid mosaic*), le *grapevine Rupestris necrosis* et le *grapevine vein feathering* (Martelli, 2014). Ces syndromes sont causés par différents virus de la famille des *Tymoviridae*, dont le *Grapevine fleck virus* (GFkV), le *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* (GAMaV) et le *Grapevine redglobe virus* (GRGV) (Martelli*,* 2014). Ces virus icosaédriques restreints au phloème sont présents à l'état latent dans de nombreuses variétés de *Vitis vinifera* et de porte-greffes d'origine américaine. Les symptômes de la marbrure se manifestent sur *Vitis rupestris* par un éclaircissement des nervures, un aspect gaufré et un repliement du limbe vers la face supérieure de la feuille (figure 1.2.D). La mosaïque étoilée se traduit par des tâches chlorotiques en forme d'étoiles. À ces symptômes foliaires s'ajoutent un retard de croissance et une diminution du rendement (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Aucun vecteur de la maladie n'est connu à ce jour mais la maladie se propage par bouturage et greffage de matériel infecté. En l'absence de gènes de résistance aux virus de la vigne, le seul moyen de lutter contre la dispersion de la maladie réside dans la sélection sanitaire du matériel végétal.

4. La maladie du court-noué de la vigne

Parmi les viroses majeures de la vigne, la maladie du court-noué est l'une des viroses la plus dommageable pour l'industrie viticole. Elle est présente dans la quasi-totalité des vignobles du monde et est causée principalement par le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et dans une moindre mesure par l'*Arabis mosaic virus* (ArMV), tous deux transmis par des nématodes. D'autres virus, essentiellement de la famille des népovirus et également transmis par nématodes sont associés à la maladie du court-noué, mais leur incidence est anecdotique comme par exemple le virus des taches en anneaux noirs de la tomate (*Tomato black ring virus*, TBRV ; Laveau *et al.,* 2013).

Malgré des progrès significatifs sur la connaissance de cette maladie ces vingt dernières années, aucune résistance n'a été identifiée à ce jour parmi les espèces de *Vitis* (Andret-Link *et al.,* 2004) et aucun traitement ne semble réellement efficace. Bien qu'aucune résistance naturelle au virus n'ait été décrite, un moyen de lutte consiste au développement de porte-greffes résistants aux nématodes (Esmenjaud et Bouquet, 2009 ; Hwang *et al.,* 2010) qui présentent cependant certains défauts agronomiques d'où leur faible utilisation. Le seul

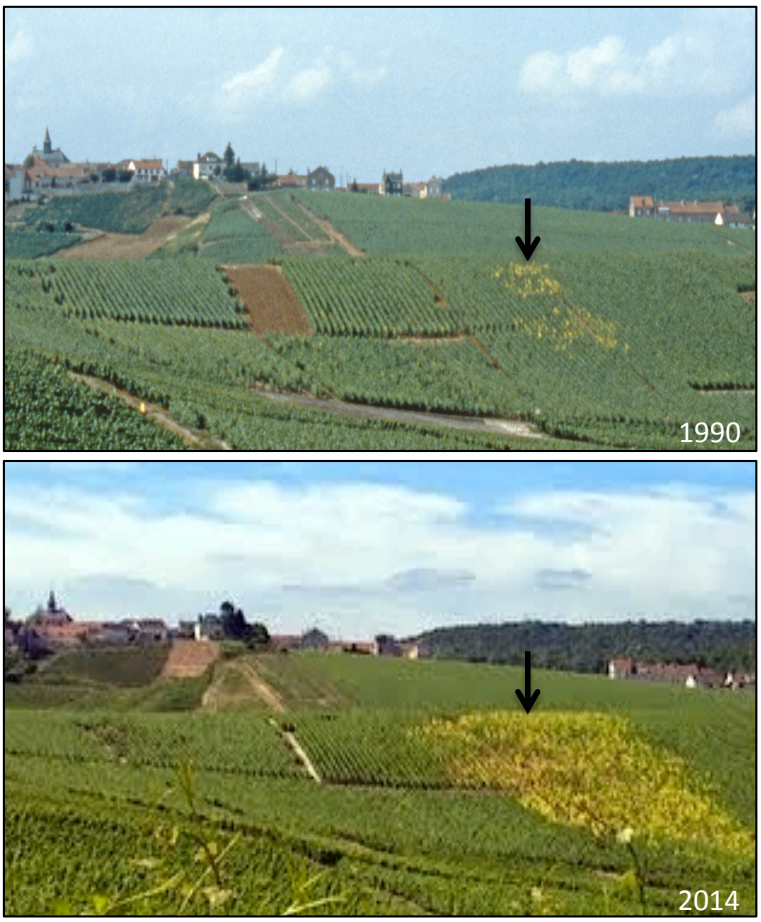


Figure 1.3. Evolution d'un foyer de court-noué dans un vignoble en Champagne sur 24 ans. La tâche jaune concentrique (indiquée par une flèche) est typique de la maladie et d'une transmission par un vecteur tellurique. La dispersion de la maladie par nématode est relativement lente, car la mobilité des nématodes dans le sol est très faible, de quelques dizaines de centimètres par an. L'agrandissement de la tâche montre bien l'absence d'efficacité des traitements pour endiguer la propagation de la maladie.

moyen de lutter contre la dispersion de cette maladie repose encore et toujours sur i) la sélection sanitaire du matériel végétal, qui consiste à certifier l'absence de ces virus par des méthodes sérologiques et d'indexage dans les vignes commercialisées, importées et exportées et ii) sur un repos du sol après arrachage des vignes d'une parcelle infectée. Avec le retrait de certaines molécules de synthèse utilisées pour contrôler les populations de nématodes vecteurs, cette maladie est aujourd'hui en progression, surtout dans les vignobles historiques cultivés depuis plusieurs siècles où la durée de repos de sol préconisée est souvent réduite.

Comme l'essentiel de l'activité de l'équipe et de mon travail de thèse porte sur les virus du court-noué de la vigne, il m'a paru nécessaire de détailler plus amplement cette maladie.

II. Historique de la maladie du court-noué

Des symptômes ressemblant à la maladie du court-noué de la vigne ont été décrits dans les temps anciens par différents auteurs (grecs, latins et arabes, de l'antiquité et du Moyen âge) mais ces récits ne permettent pas de reconnaître avec certitude cette virose. La première description suffisamment détaillée de la maladie a été réalisée par Casalis-Allut en 1865 en France et confirmée à l'étranger par Rathay (1882, Autriche), Le Coq (1894, Portugal), Ruggeri (1895, Italie) et Cholin (1896, Allemagne). Baccarini (1902) et Savastano (1907) évoquent ensuite la possibilité d'une maladie virale. L'agent infectieux est pour la première fois propagé par greffage en 1906 par Schiff-Giorgini et la maladie est effectivement attribuée plus tard à un virus, le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) par Petri (1929), Arnaud (1931) et Branas (1937) (d'après Yobrégat, 2014). L'origine virale du GFLV a été établie par l'observation de particules virales en microscopie électronique (Cadman *et al.,* 1960) et par la démonstration des postulats de Koch (Hewitt *et al.,* 1962). En 1963, Dias et ses collaborateurs transmettent, par inoculation mécanique d'un extrait de vigne infecté, le virus à l'hôte herbacé *Chenopodium amaranticolor* (Dias *et al.,* 1963).

Au vignoble, cette maladie se repère par des tâches jaunes plus ou moins concentriques qui grandissent au fil du temps (figure 1.3) synonyme d'un vecteur tellurique (Pantanelli, 1912 ; Petri, 1918) et par un aspect buissonnant des ceps. La vection de la maladie à la vigne a été attribuée au nématode ectoparasitaire *Xiphinema index* en 1958 (Hewitt *et al.,* 1958). En 1963, Dias et Harrison (1963) ainsi que Martelli et Hewitt (1963) relient des symptômes de

dégénération foliaire similaires à ceux induits par le GFLV à un autre virus, celui de la mosaïque de l'arabette, l'*Arabis mosaic virus* (ArMV). Peu de temps auparavant, Jha et Posnette (1959) et Harrison et Cadman (1959) avaient déjà mis en évidence le rôle d'un autre nématode, *Xiphinema diversicaudatum,* dans la transmission de l'ArMV. En France, c'est en Alsace que Vuittenez et Legin (1964) ont confirmé pour la première fois les résultats de transmission de l'ArMV par des nématodes. Ce virus, génétiquement proche du GFLV, est peu répandu dans les vignobles du monde mais sa prévalence est plus importante en Europe et particulièrement en France et en Allemagne. S'il est présent en dehors de l'Europe, c'est que du matériel infecté, souvent d'origine française, a été exporté.

En se basant sur la distribution du vecteur spécifique *Xiphinema index* et sur l'historique des exportations des pieds de vigne, l'origine du GFLV trouverait sa source dans la région du Caucase (Raski *et al.*, 1983). Il aurait été disséminé en même temps que la vigne par les Sumériens avant d'être dispersé dans l'ensemble du Bassin méditerranéen par les Phéniciens, les Grecs et enfin, les Romains. Ce sont ces derniers qui ont vraisemblablement introduit des ceps infectés et des nématodes *X. index* dans les régions méridionales de France, puis les moines les ont ensuite largement disséminés dans les autres régions viticoles (Esmenjaud, 2000). Avant l'arrivée du phylloxera qui a ravagé les vignobles européens au milieu du XIX^{ème} siècle, la maladie du court-noué était décrite comme « sporadique et endémique, mais jamais épidémique » (Yobrégat, 2014). Les souches infectées n'étaient pas multipliées par les viticulteurs (ni par marcottage, ni par bouturage) et les pratiques culturales d'alors (binage et labour rare) n'entrainaient que peu de déplacement de sol contaminé par des nématodes virulifères. La maladie du court-noué était circonscrite à un faible périmètre au vignoble et progressait d'une manière relativement lente. Lors de la crise phylloxérique, les arrachages massifs et la pratique de labour profond ont causé l'extension des zones infectées, par le transport de sol contenant des nématodes virulifères et la contamination des outils viticoles de travail du sol. Cependant, c'est principalement lors de la reconstruction du vignoble, par l'introduction des vignes greffées, que la maladie s'est répandue. Des cépages infectés ont été prélevés dans l'urgence, sans sélection visuelle ni sanitaire, et ont été transportés, échangés, multipliés puis implantés dans les vignobles et pépinières du monde entier, entrainant leurs contaminations, jusqu'à la mise en place d'un système de contrôle sanitaire des bois et des plants de vigne en France en 1944 (Yobrégat, 2014). La replantation de vignes sur

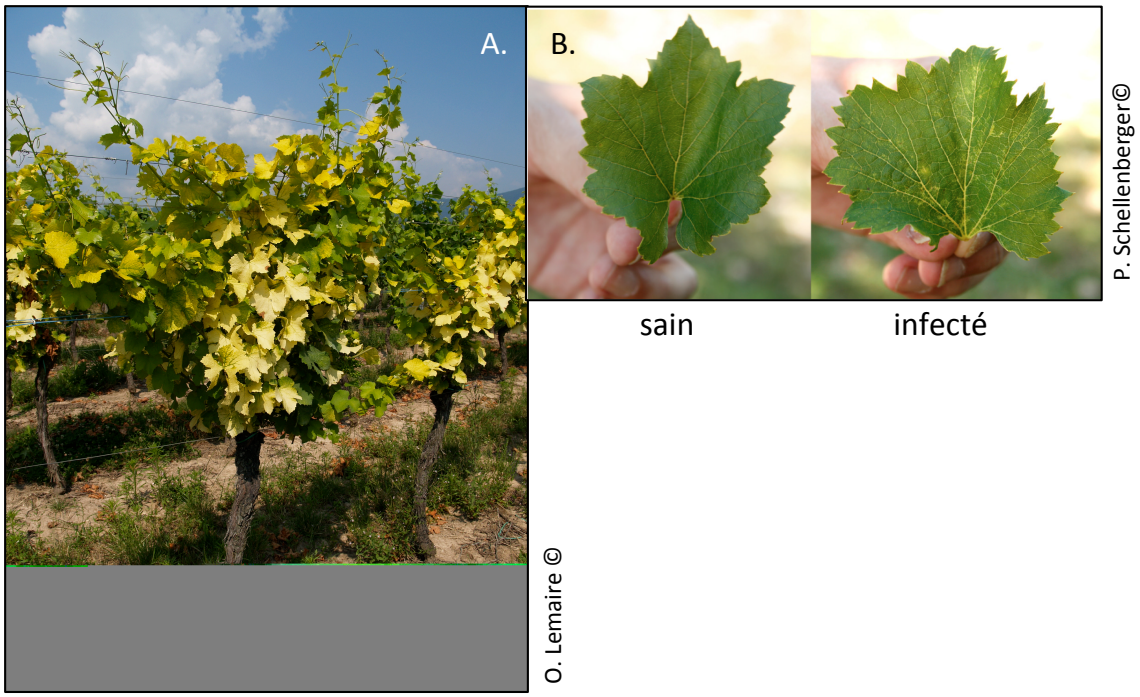


Figure 1.4. Symptômes foliaires causés par la maladie du court-noué de la vigne. Les feuilles infectées jaunissent **(A)** et présentent un limbe déformé et une indentation marquée **(B)**.

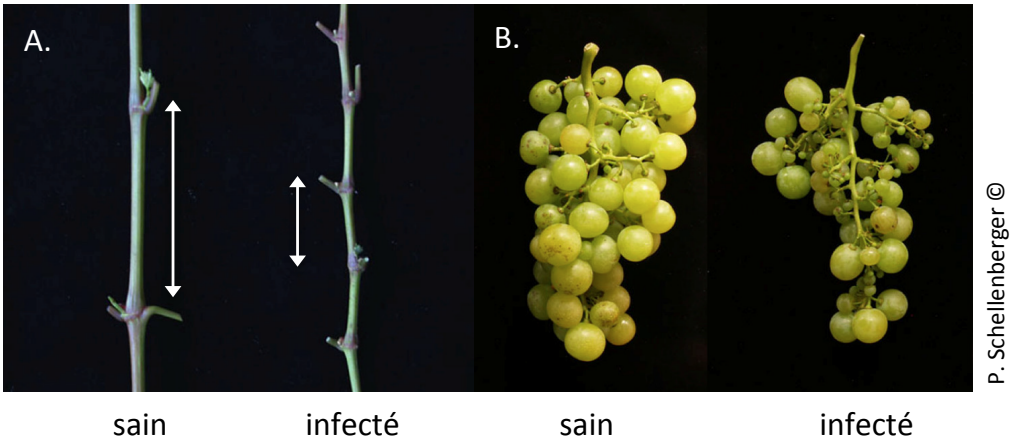


Figure 1.5. Symptômes induits par la maladie du court-noué de la vigne aux niveaux des rameaux (A) et des grappes (B). Les rameaux infectés présentent un raccourcissement des entre-nœuds. Les grappes portent des baies plus petites et à différents stades de maturation (millerandage).

d'anciennes surfaces contaminées et plus récemment l'abandon des nématicides ont également participé à la recontamination du matériel végétal, aboutissant à la situation actuelle.

III. Cycle de la vigne et symptomatologie de la maladie du court-noué

Une infection par le virus du court-noué se manifeste généralement sur un cep atteint par des modifications du phénotype ou du développement. Les symptômes sont visibles sur les différents organes de la vigne et peuvent s'observer tout au long de son cycle de développement. Ce cycle se déroule sur une année. Pendant le cycle hivernal, de novembre à mars (dans l'hémisphère nord), la vigne est en dormance. Puis, le cycle végétatif de la vigne commence début mars avec l'apparition de pleurs, synonyme de la montée de sève à l'extrémité des sarments taillés pendant l'hiver. En mars et avril, les pleurs sont suivis par le débourrement des bourgeons qui marquent l'émergence de nouveaux sarments. Les feuilles apparaissent fin avril début mai et la floraison commence fin mai, début juin. Après la pollinisation et la fécondation, les ovaires se transforment en fruits, c'est la nouaison. Les baies grossissent jusqu'en août où survient la véraison caractérisée par une coloration des baies qui vont mûrir jusqu'aux vendanges. Durant cette même période a lieu l'aoûtement des sarments porteurs des bourgeons de l'année suivante. La chute des feuilles en novembre marque le début d'un nouveau cycle hivernal.

La maladie du court-noué touche les différents organes de la vigne. Elle cause des décolorations des feuilles (jaunissement, panachures réticulées et anneaux chlorotiques), une indentation marquée en forme d'éventail ouvert (figure 1.4), d'où son nom « fanleaf » en anglais (Raski *et al.,* 1983) et une ouverture plus grande du sinus pétiolaire sont observées. Ces symptômes foliaires apparaissent généralement au printemps et persistent pendant la durée de la saison végétative (Martelli, 2014) mais peuvent s'atténuer en été en cas de fortes chaleurs (en particulier les jaunissements). La maladie affecte également les rameaux et entraîne leur croissance en zigzag, des fasciations, des ramifications anormales et des entre-nœuds plus courts (figure 1.5.A) d'où le nom de « court-noué » en français. Elle peut également retarder le débourrement et l'aoûtement des sarments et diminuer la reprise après greffage. Un manque de lignification et une plus faible étendue du tissu de

soutien sont à l'origine du port retombant du plant. La maladie entraine également une diminution du chevelu racinaire, affectant l'enracinement du cep.

La maladie du court-noué perturbe également la capacité germinative du pollen et donc la fécondation des fleurs (coulure) qui se traduit par une diminution du nombre de grappes et du nombre et de la taille des baies sur les grappes, aboutissant souvent à une perte importante de rendement lors de la récolte. Les baies mûrissent de façon hétérogène (millerandage, figure 1.5.B), entraînant une altération de la qualité des moûts (Hewitt 1954).

L'infection virale se traduit également par des altérations du métabolisme de la plante, avec un impact sur la photosynthèse, le transport phloémien, les balances hormonales et la nutrition (Walter, 1998). Ces dérèglements rendent alors le cep infecté plus sensible aux éléments climatiques (sécheresse, gel…) et diminuent sa longévité. La charge virale présente dans la plante n'est pas le seul facteur favorisant l'expression des symptômes sur vigne (Frantz et Walker, 1995) ou sur hôte herbacé (Vigne *et al.,* 2013, en annexe 1). Le type de sol, la durée d'infection, la densité de la population de nématodes présente au niveau des racines, les conditions pédoclimatiques et les pratiques culturales sont autant de facteurs qui influencent l'expression des symptômes de la maladie (Frantz et Walker, 1995). Le moment de la contamination des ceps par la maladie du court-noué est également déterminant dans l'expression des symptômes. D'une manière générale, plus l'infection intervient tôt dans l'âge d'un cep et plus les symptômes de la maladie seront précoces et sévères. La sévérité de la maladie dépend également de l'isolat de GFLV et de la sensibilité du cultivar viticole (Hewitt *et al.,* 1962 ; Martelli, 1978). Ce constat avait déjà été fait en 1956 par Vuittenez, montrant que le greffage de vignes infectées par des isolats de court-noué d'origines géographiques différentes sur une même variété de vignes indicatrices aboutissait à l'apparition de symptômes différents.

Bien que caractéristiques, les symptômes de la maladie du court-noué peuvent également être apparentés à des carences minérales (bore, fer) ou à des troubles physiologiques causés par les intempéries (Galet, 1977). De ce fait, une simple observation visuelle des symptômes ne permet généralement pas d'attester de manière formelle de la présence de la maladie, d'autant plus que certains cépages peuvent ne pas présenter de symptômes visibles, surtout s'ils sont infectés avec des souches peu virulentes. Pour cela, un diagnostic par des

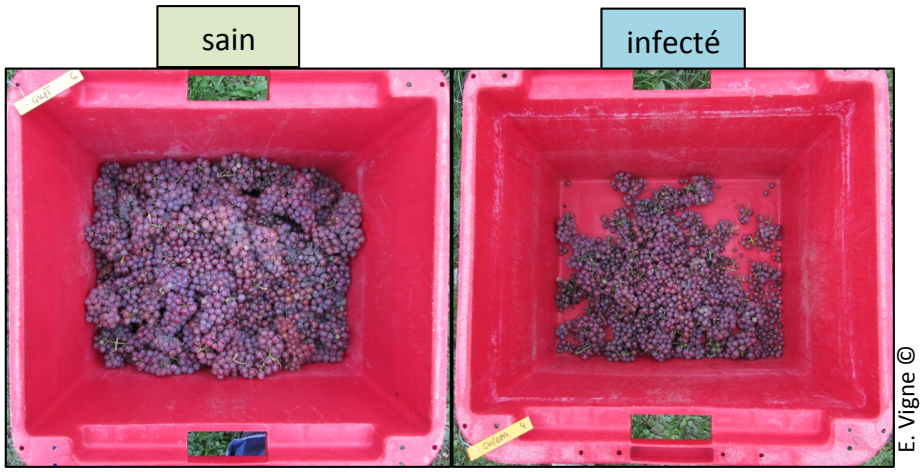


Figure 1.6. Impact de la maladie du court-noué sur le rendement. Comparaison des rendements après récolte sur 8 pieds de Gewurztraminer sains ou infectés, plantés la même année. Les pertes peuvent atteindre jusqu'à 80% de la récolte.

techniques sérologiques et moléculaires s'avère nécessaire, particulièrement compte tenu des mesures drastiques à prendre en cas de présence effective de la maladie.

IV. Impact agronomique et économique de la maladie du court-noué

La maladie du court-noué provoque l'affaiblissement des ceps et réduit globalement leur longévité de moitié (Andret-Link *et al.,* 2004). Elle conduit généralement à l'arrachage précoce des ceps après dévitalisation et induit un remplacement plus fréquent des parcelles. Aucune résistance à la maladie n'a été identifiée à ce jour parmi les espèces de *Vitis* (Laimer *et al.,* 2009) et l'utilisation de nématicides chimiques permettant de contrôler la population de nématodes vecteurs a été interdite en Europe depuis 2007 (directive 91/414/CEE). Il n'existe pour le moment aucun moyen de lutte efficace et économiquement acceptable contre cette maladie, et la recontamination des vignes nouvellement plantées est souvent inévitable.

La maladie du court-noué perturbe également la conduite des travaux viticoles. Le palissage, qui a lieu en juin, consiste à séparer les rameaux et à les maintenir organisés par des fils pour optimiser l'exposition de la surface foliaire au soleil et augmenter l'efficacité de la photosynthèse afin d'améliorer le rendement du pied. Associé à l'épamprage, à l'écimage et au rognage des vignes il permet d'éviter l'entassement de végétation, limitant l'ombre et l'humidité, propices au développement de maladies. Le rabougrissement des ceps infectés ne permet plus un palissage mécanisé et rend obligatoire le palissage manuel.

L'impact de la maladie sur la récolte peut être considérable. La baisse de rendement peut atteindre jusqu'à 80% (figure 1.6 ; Komar *et al.,* 2008) et est due à la diminution de la vigueur des ceps et surtout aux phénomènes de coulure et de millerandage qui affectent la floraison et la maturation des baies de raisin. L'impact de la maladie sur la qualité de la récolte est plus difficile à établir mais de nombreuses publications scientifiques attestent que la maladie du court-noué entraine une modification des taux de sucre et d'acidité (Andret-Link *et al.,* 2004) et que la maladie peut également impacter la finesse et les tanins d'un vin (Walter, 1996). Malgré cela, certains viticulteurs minoritaires prétendent que le court-noué peut engendrer une augmentation de la teneur en sucre des fruits ou de l'acidité

des vins et prêtent alors une influence bénéfique au GFLV, ceci en dépit d'un rendement plus faible et d'une modification de l'équilibre sucre/acide, pourtant primordial à la préservation de la qualité des arômes et la conservation des vins (Andret-Link *et al.,* 2004 ; Komar *et al.,* 2008). Toutefois, ces allégations ne sont fondées sur aucune preuve scientifique et résultent plus d'un ressenti personnel que d'une comparaison rigoureuse entre des vins issus de ceps sains ou de ceps infectés.

Avec un chiffre d'affaire de 12 milliards d'euros en 2015 dont 8,27 milliards d'euros à l'exportation (France AgriMer, 2016), la viticulture est le deuxième secteur économique le plus important en France, après celui de l'aéronautique et devant les parfums et cosmétiques. Un inventaire sanitaire a conduit l'Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS, devenu depuis FranceAgriMer) à constater que la maladie du court-noué est présente dans 60% du vignoble français avec 30% de vignobles sévèrement atteints (Demangeat *et al.,* 2005). Compte tenu de la surface de vignobles infectés et des pertes de rendement connues, l'impact économique de la maladie du court-noué sur la production viticole française a été estimé à environ un milliard d'euros par an (Fuchs, 2008). Cette estimation est en accord avec les témoignages de viticulteurs qui gèrent cette maladie au quotidien. Ainsi, en 2014, des mesures de gestion de la maladie du court-noué ont conduit une grande maison de vins française à arracher, puis à mettre au repos, 25 hectares de leur domaine. Ceci représente une perte nette de récolte d'environ 300 000 kg de raisin et ne tient pas compte des autres parcelles de vignes atteintes par la maladie mais toujours en exploitation. Pour maintenir une production de vin équivalente à l'année 2013, cette entreprise a dû recourir à l'achat de raisin pour un coût estimé à 1,6 millions d'euros pour l'année 2014.

V. Etiologie

La maladie du court-noué est causée par des virus appartenant au genre *Nepovirus*. Ce genre, rattaché à l'ordre des *Picornaviridae*, à la famille des *Secoviridae* et à la sous-famille des *Comovirinae*, comprend une trentaine d'espèces dont le virus des taches annulaires du tabac (*Tobacco ringspot virus ;* TRSV) est l'espèce-type (Sanfaçon *et al.,* 2009). Les népovirus pour **Ne**matode transmitted **Po**lyhedral virus (Cadman, 1963), sont des virus non enveloppés d'environ 30 nm de diamètre. Ce sont des virus dont le génome bipartite est constitué de

	Virus	Nématode vecteur	Localisation du virus	Première description
Sous-groupe A	*Arabis mosaic virus (ArMV)*	*X. diversicaudatum*	Europe, Turquie, Etats-Unis	Panjan and Saric, 1963
	Grapevine deformation virus (GDefV)	inconnu	Turquie (sud-est du pays)	Cigsar et al., 2003
	Grapevine fanleaf virus (GFLV)	*X. index*	Monde	Cadman et al., 1960; Vuittenez, 1960
	Raspberry ringspot virus (RpRSV)	*L. macrosoma* *L. elongatus* *P. maximus*	Allemagne, Suisse	Brecks et Stellmach, 1966
	Tobacco ringspot virus (TRSV)	*X. americanum*	Canada, USA	Gilmer et al., 1970
Sous-groupe B	*Artichoke Italian latent virus (AILV)*	*L. apulus*	Bulgarie	Savino et al., 1976
	Grapevine Anatolian tingspot virus (GARSV)	inconnu	Turquie (sud-est du pays)	Gokalp et al., 2003
	Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)	inconnu	Autriche, Croatie, Hongrie, Tchécoslovaquie	Martelli et al., 1965
	Tomato blackring virus (TBRV)	*L. attenuatus* *L. elongatus*	Europe, Israël	Stellmach et Bercks, 1963
Sous-groupe C	*Cherry leafroll virus (CLRV)*	inconnu	Monde	Ipach et al., 2003
	Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)	inconnu	Bulgarie, Croatie, Hongrie, Portugal	Ferreira et De Sequeira, 1972
	Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)	inconnu	inconnu	Uyemoto et al., 1977
	Peach rosette mosaic virus (PRMV)	*X. americanum* *L. diatecturus* *L. elongatus*	Canada, USA	Dias, 1968
	Tomato ringspot virus (ToRSV)	*X. californicum* *X. rivesi*	Canada, USA	Gooding et Hewitt (1962)
	Grapevine Tunisian ringspot (GTRSV)	inconnu	Tunisie	Ouertani et al., 1991
Genre indéterminé	*Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)*	*X. diversicaudatum*	Europe, Turquie	Bercks et al., 1977

Tableau 1.2. Taxonomie des népovirus infectant la vigne (d'après Esmenjaud, 2000).

deux molécules d'ARN linéaire (ARN1 and ARN2), simple brin et de polarité positive (ssRNA). Les népovirus ont été regroupés en trois sous-groupes (A, B et C) basés sur la composition des séquences et la longueur de l'ARN2 (Fauquet *et al.,* 2005) et sur la composition des régions 3' non codantes des ARN1 et 2 (Sanfaçon *et al.,* 2009).

Quinze népovirus et un virus d'un genre non assigné, le *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), induisent la maladie du court-noué de la vigne (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Les virus types des sous-groupes A, B et C sont respectivement le TRSV, le *Tomato black ring virus* (TBRV) et le *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Tableau 1.2). Le GFLV et l'ArMV font partie du sous-groupe A comme le *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) et le *Grapevine deformation virus* (GDefV) (Sanfaçon *et al.,* 2009). Les virus animaux comme les poliovirus (responsables de la poliomyélite) appartiennent au même ordre que les népovirus et ressemblent par bien des aspects au GFLV (Le Gall *et al.,* 2008) même si leurs génomes ne sont composés que d'un brin d'ARN unique.

VI. Cycle de multiplication du *Grapevine fanleaf virus*

1. Structure et expression du génome viral

Le GFLV est l'un des népovirus dont l'étude de la structure et de l'expression du génome est la plus avancée (Hefferon et Fuchs, 2006). La majorité des données provient d'études réalisées sur l'isolat GFLV-F13, isolé d'un cep de Muscat provenant de Frontignan, en France (Vuittenez *et al.,* 1964). La purification du GFLV et l'analyse sur un gradient de sucrose permet de distinguer trois types de capsides virales de densités différentes appelées T (pour Top, capside vide), M (pour Middle, capside contenant l'ARN2) et B (pour Bottom, capside contenant les ARN 1 et 2), (Quacquarelli *et al.,* 1976).

Le génome des népovirus du sous-groupe A comme le GFLV et l'ArMV sont constitués de deux ARN simple brin de polarité positive, nommés ARN1 et ARN2 (Quacquarelli *et al.,* 1976) protégés par une capside virale polyédrique non enveloppée. Ces deux ARN génomiques sont nécessaires à l'infection systémique de la plante hôte (Hefferon et Fuchs, 2006). Chaque ARN est composé d'un cadre de lecture ouvert ou ORF (pour *Open Reading Frame*)

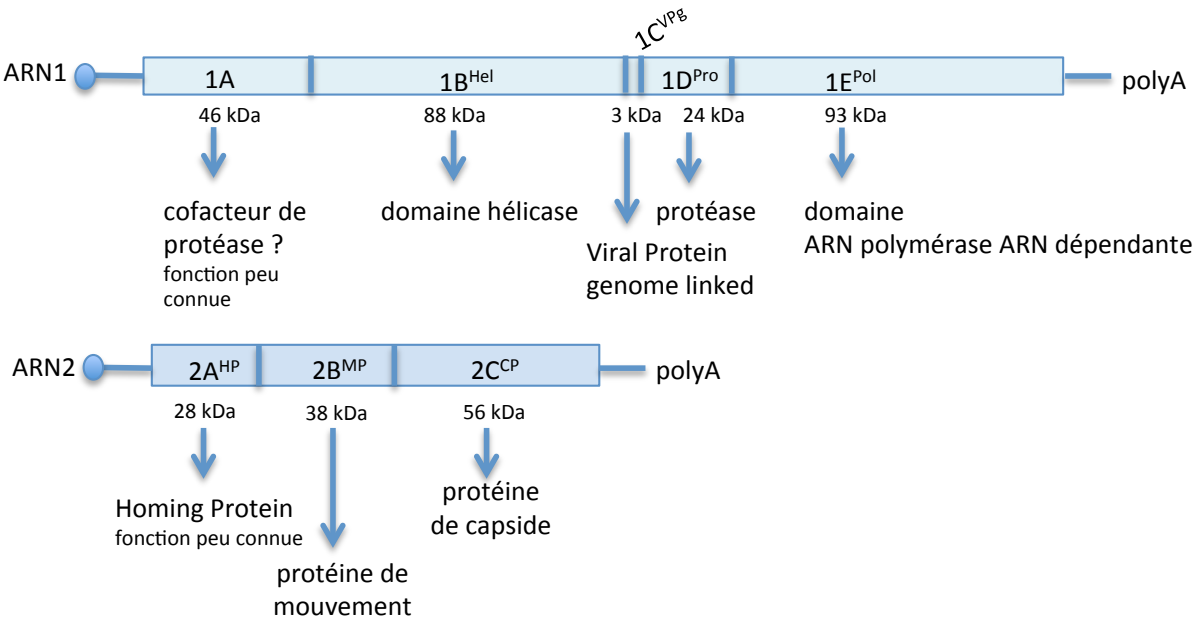


Figure 1.7. Structure et organisation génomique des ARN1 et 2 du *Grapevine fanleaf virus*. Les deux ARN comportent une phase de lecture ouverte symbolisée ici par des rectangles. Les ARN viraux sont protégés par la VPg en 5' (représentée par un rond bleu) et polyadénylé en 3'.

unique qui code pour une polyprotéine, elle-même maturée par la protéase virale en plusieurs protéines fonctionnelles (Andret-Link *et al.,* 2004 ; Margis *et al.,* 1991, 1992, 1993 et 1994). L'ARN1 code majoritairement pour des protéines nécessaires à la réplication du virus, tandis que l'ARN2 code pour des protéines impliquées dans le mouvement et la structure du virus (figure 1.7). Chaque ARN viral est lié de manière covalente à une protéine VPg (*Viral Protein genome-linked*) en 5' (Pinck *et al.,* 1991) et est polyadénylé en 3' (Serghini *et al.,* 1990 ; Ritzenthaler *et al.,* 1991). Le génome de cinq isolats de GFLV ont été entièrement séquencés : l'isolat français F13 (Rtizenthaler *et al.,* 1991 ; Serghini *et al.,* 1990) l'isolat hongrois Gloria hungariae GHu (Vigne *et al.,* 2013), l'isolat SAPCS3 sud africain (Lamprecht *et al.,* 2012) et les isolats américains WAPN172 et WAPN6131 (Mekuria *et al.,* 2009).

La polyprotéine P1, codée par l'ARN1, est clivée en cinq protéines différentes : 1A, $1B^{Hel}$, $1C^{VPg}$, $1D^{Pro}$, et $1E^{Pol}$. Toutes ces protéines sont nécessaires à la réplication de l'ARN1 (Viry *et al.,* 1993) et agissent en *trans* pour la réplication de l'ARN2. La protéine 1A est peu connue mais est apparentée à un cofacteur de la protéase (Ritzenthaler *et al.,* 1991) et semble avoir un rôle dans la structuration des complexes de réplication du virus (Ritzenthaler *et al.,* 2002). Localisée dans le noyau lorsqu'exprimée de manière ectopique, sa fonction est à l'étude dans l'équipe de Christophe Ritzenthaler (thèse de François Berthold, 2015). La protéine $1B^{Hel}$ contenant un domaine NTB (*Nucléoside Triphosphate Binding domain*) est considérée comme une hélicase (Ritzenthaler *et al.,* 2002). Cette protéine possède quatre domaines transmembranaires et se retrouve dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE), participant à l'ancrage du complexe de réplication du virus (Wang *et al.,* 2004). Chez l'ArMV, cette protéine est clivée en deux parties, l'hélicase et une protéine hydrophobe dénommée X2 qui aurait un rôle dans l'ancrage du virus dans les membranes du complexe de réplication (Wetzel *et al.,* 2008). La protéine $1C^{VPg}$ est fixée de manière covalente à l'extrémité 5' des ARN viraux. Elle interagit avec la machinerie transcriptionelle cellulaire et, à l'instar des VPg d'autres virus, elle pourrait jouer un rôle dans la réplication virale (Jiang et Laliberté, 2011). La protéase à cystéine $1D^{Pro}$ du GFLV clive en *cis* la polyprotéine P1 aux sites de clivage Cys/Ala, Cys/Ser, Gly/Glu et Arg/Gly (Andret-Link *et al.,* 2004) et agit en *trans* pour le clivage de la polyprotéine P2. La protéine $1E^{Pol}$ code pour une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). La séquence de la $1E^{Pol}$ est fortement conservée parmi les isolats de GFLV (Oliver *et al.,* 2010) et montre une identité de séquence élevée

avec celle de l'ArMV (Gottula *et al.,* 2013). La partie C-terminale de cette protéine a récemment été identifiée comme étant le déterminant viral des symptômes chez les tabacs *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana clevlandii* (Vigne *et al.,* 2013, article en annexe 1).

La maturation de la polyprotéine P2 issue de l'ARN2, conduit à la production de 3 protéines : la protéine $2A^{HP}$ de fonction peu connue, la protéine de mouvement $2B^{MP}$ et la protéine de capside $2C^{CP}$. Ces protéines sont issues du clivage en *trans* de la polyprotéine P2 par la protéase $1D^{Pro}$ aux sites de clivage Cys/Ala et Arg/Gly respectivement (Andret-Link *et al.,* 2004). La protéine $2A^{HP}$ est nécessaire à la réplication de l'ARN2 et permet son adressage à l'usine virale, lieu de réplication du virus, d'où son nom de Homing Protéine (Gaire *et al.,* 1999 ; Ritzenthaler *et al.,* 2002). Cette protéine, exprimée transitoirement en plante *Nicotiana benthamiana* fusionnée à la TagRFP montre une localisation dans des structures granuleuses cytoplasmiques. En cas de co-expression avec la protéine 1A, ces deux protéines de fonctions peu connues co-localisent à la fois dans des ces structures granuleuses mais également dans le noyau. Ces protéines sont capables de se relocaliser mutuellement et leur interaction a été démontrée par FRET (thèse de François Berthold, 2015). La protéine $2B^{MP}$ est impliquée dans le mouvement du virus de cellule à cellule. Elle s'auto-assemble pour former des tubules qui, une fois ancrées dans les plasmodesmes, permettent le passage des particules virales d'une cellule à une autre (Ritzenthaler *et al.,* 1995 ; Ritzenthaler *et al.,* 2002 ; Laporte *et al.,* 2003 ; Amari *et al.,* 2010). En effet, le diamètre moyen des plasmodesmes est estimé à 2.5 nm alors que les capsides du GFLV mesurent environ 30 nm. Les tubules, formés de protéines $2B^{MP}$, modifient l'ouverture des plasmodesmes pour permettre le passage des particules virales à la cellule végétale voisine. L'adressage de la $2B^{MP}$ aux plasmodesmes via les microtubules est tributaire du système de sécrétion de l'appareil de Golgi (Laporte *et al.,* 2003) et son ancrage résulte de son interaction avec les protéines de la famille multigénique PDLP (*PlasmoDesmata Located Protein*) notamment PDLP1, PDLP2 et PDLP3 (Amari *et al.,* 2010). Le transport de PDLP1 aux plasmodesmes est dépendant d'une voie de sécrétion impliquant la myosine IX. Ce système d'adressage est détourné par le GFLV pour permettre l'ancrage des tubules aux plasmodesmes et le passage des particules virales d'une cellule végétale à une autre (Amari *et al.,* 2011). Le virus est ensuite transporté à longue distance par le phloème. Les neufs derniers résidus de la $2B^{MP}$ semblent participer à l'interaction spécifique entre la $2B^{MP}$ et la $2C^{CP}$ et leur mutation en

leurs équivalents ArMV abolie la capacité d'infection systémique du GFLV (Belin *et al.,* 1999 ; Andret-Link *et al.,* 2004).

La protéine $2C^{CP}$ est la protéine de capside. Elle permet l'encapsidation des ARN viraux et leur passage d'une cellule au travers des tubules. Soixante protéines $2C^{CP}$ s'auto-assemblent pour former une capside icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre et de symétrie pseudo T=3 (Prasad et Schmid, 2012 ; Schellenberger *et al.,* 2011). Chaque ARN peut être encapsidé séparément ou ensemble et la capside est également capable de s'auto-assembler et de former des particules virales vides encore appelées *virus like particules* (VLP ; Quacquarelli *et al.,* 1976, Belval *et al.,* 2016 en annexe 2). La structure atomique du GFLV a été obtenue à une résolution de 2.7 Å en combinant une approche cristallographique et une approche de cryomicroscopie électronique (Schellenberger *et al.,* 2011). Les particules d'ArMV présentent la même organisation structurale et sont également composées de 60 unités de capsides. Un modèle de la particule virale d'ArMV-S a été reconstruit avec une résolution de 6.5 Å par une approche de cryomicroscopie (Lai-Kee-Him *et al.,* 2013).

En plus des deux ARNs génomiques, certains népovirus comme le GFLV comportent un ARN satellite (ARNsat) codant pour une protéine unique, qui dépend des ARN1 et 2 pour sa réplication et son encapsidation (Pinck, 1988 ; Hans *et al.,* 1992, 1993). Cet ARNsat est lié à la VPg en 5' et est polyadénylé en 3'. L'ARNsat peut être encapsidé seul ou avec l'ARN2 (Murant et Mayo, 1982). L'ARNsat de la souche GFLV-F13 a été décrit par Pinck *et al.,* (1988) et séquencé par Fuchs *et al.,* en 1989. Plus récemment, Gottula *et al.,* (2013) ont décrit deux nouveaux ARN satellites, associés à des isolats viraux californiens, GFLV-R2 et GFLV-R6. Ces ARNsat ont une taille de 1140 nucléotides, soit une taille comparable à celle de l'ARNsat du GFLV-F13 (1114 nucléotides). Des analyses de séquences ont montré que ces ARNsat pourraient être apparentés à un ARNsat provenant de Bordeaux, France. Leur distribution dans le vignoble californien montre que des plants infectés contenant l'ARNsat sont adjacents à des plantes infectées ne contenant pas cet ARNsat. Ceci suggère que l'ARN satellite peut être perdu au fil des infections de plante à plante.

De fonction pour l'instant inconnue, la présence de ces ARNsat ne semble avoir aucun effet sur l'expression des symptômes sur *C. quinoa* ou sur vigne (Gottula *et al.,* 2013). La distribution de ces ARNsat au vignoble a été estimée à 14.7% chez 34 vignes infectées par le

GFLV (Saldarelli *et al.,* 1993). Des résultats similaires (17%) ont été observés pour la distribution d'ARNsat pour l'ArMV (Wetzel *et al.,* 2006).

2. Variabilité génétique

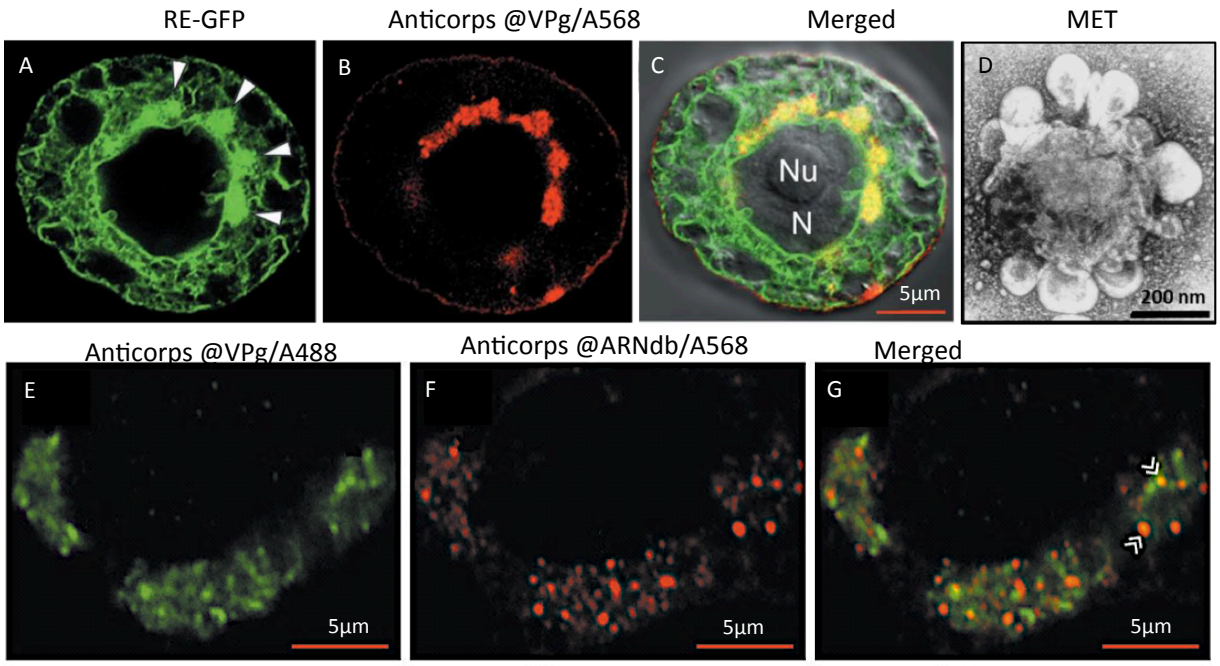
L'analyse de la diversité génétique virale au vignoble a clairement montré que les virus de vigne existent sous forme d'une population représentée par différents isolats viraux issus de mutations, appelés quasi-espèces (Drake *et al.,* 1998, Garcia-Arenal *et al.,* 2003 ; Naraghi-Arani *et al.,* 2001). La diversité génétique du GFLV au vignoble est large (Oliver *et al.,* 2010 ; Sokhandan-Bashir *et al.,* 2012) et s'explique en partie par le fait que la polymérase RdRp $1E^{Pol}$ ne possède pas d'activité de relecture, générant ainsi une variabilité génétique lors de la réplication virale (Steinhauer *et al.,* 1992 ; Oliver *et al.,* 2010). Une deuxième source de diversité génétique provient de recombinaisons génétiques entre différents isolats appartenant ou non à la même espèce (Naraghi-Arani *et al.,* 2001), car la vigne étant une plante pérenne, elle est sujette à des infections multiples sur le long terme.

La recombinaison génétique est définie comme l'échange de fragments de gènes entre deux virus génétiquement différents pendant l'étape de réplication (Burjaski, 2013). Pour que la recombinaison ait lieu, deux virus doivent donc infecter simultanément une même cellule végétale. La co-infection d'une vigne par plusieurs isolats viraux peut provenir de différents évènements de transmission par nématode, par la plantation de matériel infecté dans un vignoble infesté de nématodes virulifères, mais aussi par greffage d'un greffon infecté sur un porte-greffe déjà infecté par un autre isolat viral. Des évènements de recombinaison ont été caractérisés entre différents isolats de GFLV (Vigne *et al.,* 2004, 2005 ; Boulila, 2007 ; Pompe-Novak *et al.,* 2007) mais aussi entre le GFLV et d'autres népovirus. Des recombinaisons génétiques entre le GFLV et l'ArMV ont en effet été décrites à plusieurs reprises (Vigne *et al.,* 2008, Mekuria *et al.,* 2009 ; Oliver *et al.,* 2010). Dans ces publications, plusieurs sites de recombinaisons dans les gènes $2A^{HP}$ et $2B^{MP}$ ont été identifiés. Par exemple, l'isolat GFLV-GHu provient d'une recombinaison entre le GFLV et l'ArMV au niveau de la région 5'UTR de l'ARN2 et des gènes $2A^{HP}$ et $2B^{MP}$ (Vigne *et al.,* 2008). Des recombinaisons inter-espèces ont également été identifiées entre le GFLV, l'ArMV et le GDef aux niveaux des gènes $2A^{HP}$ et $2B^{MP}$. Récemment, une étude phylogénétique du GDef a permis de montrer que ce virus est issu de recombinaisons entre le GFLV et l'ArMV, et

décrit pour la première fois un cas de recombinaison interspécifique impliquant le gène $2C^{CP}$ (Elbeaino *et al.*, 2012).

Ces phénomènes de recombinaison sont amplifiés par l'échange, le greffage et le bouturage puis par l'implantation de matériel infecté. Oliver *et al.,* (2010) ont réalisé une étude phylogénétique du GFLV basée sur les séquences des gènes $1E^{Pol}$, $2A^{HP}$, $2B^{MP}$ et $2C^{CP}$ ainsi que sur l'ARN2 complet. Des travaux de séquençage ont permis d'étudier la parenté d'isolats provenant des vignobles de différents endroits du globe (France, Afrique du Sud, Iran, Etats-Unis…). Leur analyse montre qu'il n'existe pas de ségrégation génétique des différents isolats viraux en fonction de leur provenance géographique. Le fait que les isolats récoltés dans différents vignobles puissent avoir des séquences similaires peut s'expliquer par leur provenance d'une source identique. Ceci suggère que l'exportation et l'importation de matériel infecté ont effectivement contribué à la contamination des vignobles du monde entier (Oliver *et al.,* 2010 ; Eichmeier *et al.,* 2010).

Les mutations et les recombinaisons intra et inter-espèces jouent un rôle important dans l'évolution des virus (Oliver *et al.,* 2010) et peuvent conduire à l'émergence de nouveaux variants viraux (Garcia-Arenal *et al.,* 2003 ; Oliver *et al.,* 2010) qui pourraient échapper aux outils de détections actuels, dont la majorité cible la CP. Il est donc important de s'intéresser à la génétique des populations virales, à l'émergence de nouveaux isolats viraux et à la diversité de la CP. Dans ce cadre, des études ont été réalisées sur le gène $2C^{CP}$, à partir entre autres d'isolats français (Vigne *et al.,* 2004), slovaques (Pompe-Novak *et al.,* 2007), italiens (Terlizzi *et al.,* 2015) ou américains (Naraghi-Arani *et al.,* 2001; Mekuria *et al.,* 2009 ; Oliver *et al.,* 2010). D'après ces différentes publications, les séquences de la protéine de capside peuvent atteindre 17% de divergence de séquence nucléotidique et 9% de divergence de séquence en acides aminés, bien moins que celles observées pour la protéine $2A^{HP}$ dont le degré de divergence nucléotidique peut atteindre 41% et 33% de divergence en acides aminés (Oliver *et al.,* 2010 ; Elbeaino *et al.,* 2014). La plus faible diversité génétique et la faible fréquence de recombinaison observées pour le gène de capside peut s'expliquer par les différentes contraintes biologiques exercées sur la protéine CP. Cette protéine est en effet impliquée dans l'encapsidation des ARN viraux, dans le mouvement de cellules à cellules et dans la transmission spécifique par les nématodes vecteurs. La plus faible diversité génétique de la CP en fait donc une cible de choix pour la détection de virus comme



Ritzenthaler et al., 2002

Figure 1.8. Observation par microscopie confocale (photos A à C et E à G) et par microscopie électronique à transmission (MET, photo D) du compartiment viral du GFLV à partir de protoplastes de cellules de tabac T-BY2. Ces cellules transgéniques expriment de manière constitutive la GFP au niveau du réticulum endoplasmique (RE), panel A. Les flèches indiquent une condensation du RE, marquant la présence de l'infection virale. Le marquage de la VPg est réalisé grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome (panel B et E) et montrent la co-localisation de la VPg avec le RE (panel C) et avec les formes réplicatives du virus (indiqué par les doubles flèches, panel G) révélée par les anticorps anti-ARN double brin (ARNdb, panel F). Ceci suggère que le virus utilise des membranes dérivées du RE pour se répliquer.

le GFLV ou l'ArMV. Elle confère une fiabilité aux méthodes de diagnostic sérologiques ciblant cette protéine virale et permet la détection de nombreux variants viraux.

3. Réplication

La réplication du GFLV a lieu dans des usines virales situées dans la région péri-nucléaire, qui dérivent des membranes du RE dans lesquelles se trouvent les formes réplicatives double brins du virus et la VPg (Rizenthaler *et al.,* 2002 ; Gaire *et al.,* 1999 ; figure 1.8). L'utilisation de brefeldine A, inhibant le trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et le RE, et de la cérulénine, inhibant la synthèse des phospholipides essentiels à la composition des membranes, ont un effet inhibiteur sur la réplication du GFLV. Ceci suggère que la réplication du GFLV dépend à la fois du recrutement des membranes du RE mais aussi de la synthèse des lipides. L'ARN1 est nécessaire à la réplication des ARN viraux et est responsable de la formation des usines virales (Ritzenthaler *et al.,* 2002), qui dans le cas du GFLV, adoptent une morphologie en rosette similaire à celle induite par le poliovirus en cellules animales (Gaire et al. 1999). L'ARN1 suffit à sa propre réplication alors que l'ARN2 nécessite les protéines codées par l'ARN1 pour se répliquer (Viry *et al.,* 1993). Enfin, la protéine $2A^{HP}$ est nécessaire mais pas suffisante à la réplication de l'ARN2 (Gaire *et al.,* 1999).

4. Transmission

A. Transmission par les nématodes vecteurs

Les nématodes du genre *Xiphinema* qui appartiennent à la famille des *Longidoridae* et à l'ordre des *Dorylamidae* (Taylor and Brown, 1997) sont des nématodes ectoparasites présents dans la rhizosphère de plantes herbacées ou ligneuses et se rencontrent dans quasiment tous les sols des vignobles du monde entier. Les nématodes sont des vers ronds non segmentés filiformes à tous les stades de leur développement, dont le corps est recouvert d'une épaisse cuticule. *Xiphinema index* (figure 1.9.A), d'une longueur d'environ 3 mm au stade adulte, est le vecteur exclusif du GFLV (Taylor et Brown, 1997). La mise en évidence de la transmission du GFLV par un nématode ectoparasite a été la première démonstration de la transmission d'un phytovirus par un nématode (Hewitt *et al.,* 1958). Ceci a été suivi peu après par la mise en évidence de la transmission de l'*ArMV* par

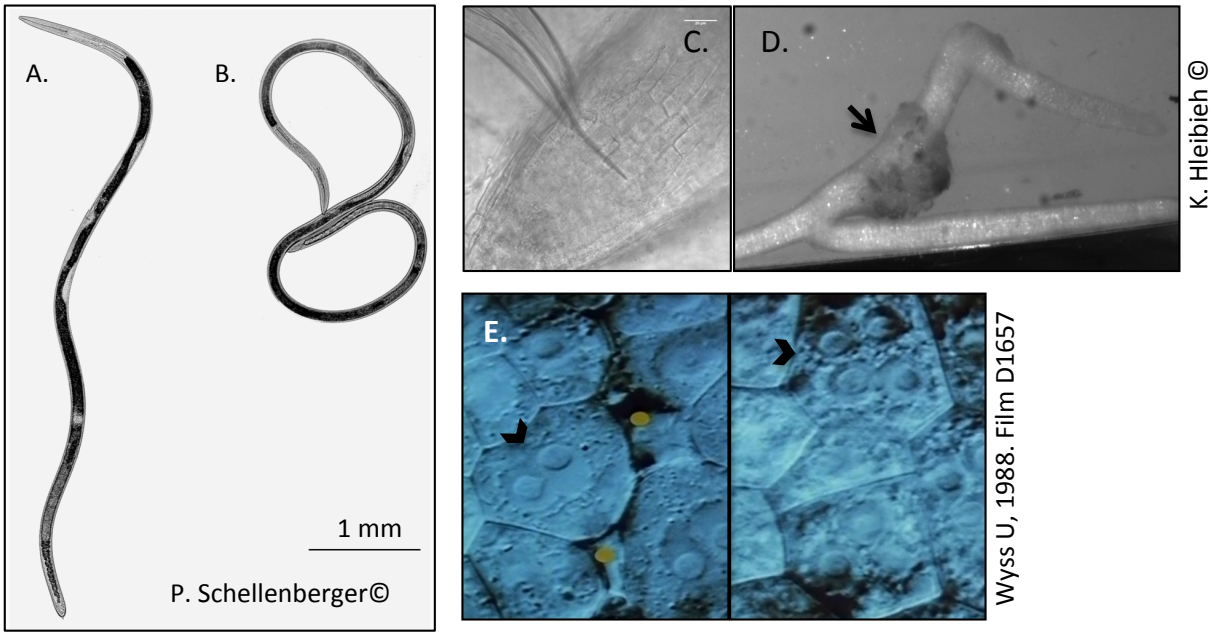


Figure 1.9. Photographies en microscopie optique d'une femelle adulte de *Xiphinema index* (A) et d'une femelle adulte de *X. diversicaudatum* (B). Ces deux espèces de nématodes transmettent respectivement le GFLV et l'ArMV. **L'attaque d'une racine de vigne par le nématode *Xiphinema index* (C) induit la formation de galle (D) qui renferme des cellules plurinuclées (E).** Le nématode pique les racines à l'aide de son stylet lors de la prise alimentaire. La galle résultant de la piqure est indiquée par une flèche panel B. Les cellules plurinucléés, indiquées par une flèche noire panel C, servent de cellules de transfert de nutriments entre la plante et le nématode

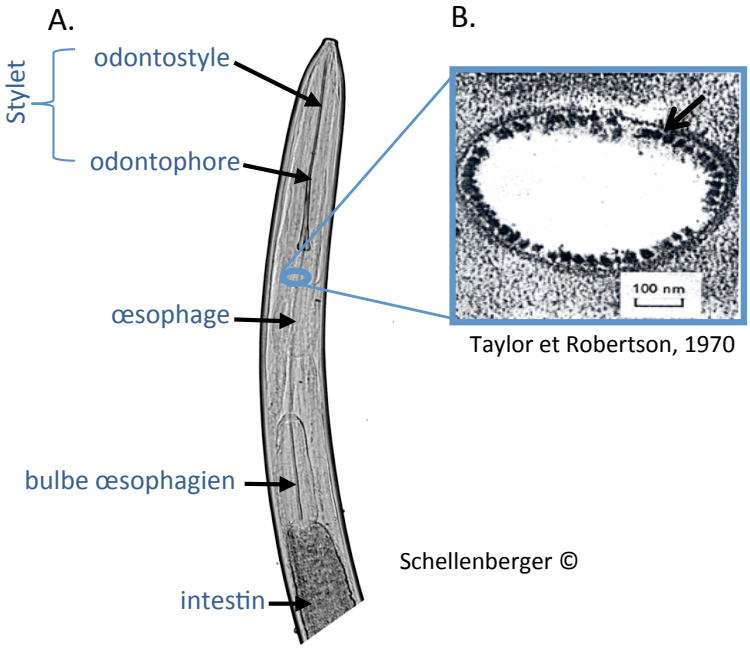


Figure 1.10. Description anatomique de la partie antérieure du nématode *Xiphenima index* (A) et coupe transversale de la zone de rétention des particules virales au niveau de l'appareil alimentaire du nématode (B). Les particules virales sont indiquées par une flèche. Lors de la prise alimentaire, le virus est retenu au niveau de l'œsophage et de l'odontophore du nématode .

Xiphinema diversicaudatum (figure 1.9.B ; Jha et Posnette, 1959 ; Harrison et Cadman, 1959).

Les nématodes ectoparasitaires possèdent un long stylet buccal qui leur permet de s'alimenter en profondeur des racines pour pomper le contenu des cellules végétales. C'est au cours de ce processus alimentaire sur les racines des plantes hôtes que les nématodes peuvent acquérir le virus, en moins de 15 minutes. La prise alimentaire induit l'apparition de cellules plurinucléées qui semblent servir de cellules de transfert de nutriments entre la plante et le nématode, et la formation de galles (figure 1.9 C, D et E Brown *et al.,* 1995 ; Wyss, 2000). La nutrition des nématodes au niveau d'un site peut durer de quelques minutes à plusieurs jours. Après la prise alimentaire, le virus est retenu spécifiquement dans l'appareil alimentaire au niveau de l'œsophage, de l'odontophore et du bulbe œsophagien du nématode (figure 1.10 ;Taylor et Brown, 1997). La transmission du GFLV à une plante saine peut se faire en quelques minutes (Das et Raski, 1968) et ne nécessite aucune période de latence (O'Bannon et Inserra, 1990). Lors du processus alimentaire, le nématode transmettrait le virus avec le flux du contenu de ses glandes salivaires qu'il déverse dans la cellule pour en digérer son contenu et faciliter l'adsorption du cytoplasme. La dispersion de la maladie par nématode est relativement lente, car la mobilité des nématodes dans le sol est très faible. Ils ne se déplacent que de quelques dizaines de centimètres par an, vitesse de déplacement qui varie en fonction de la nature du sol et de la présence de plantes hôtes (Taylor et Brown, 1997). Cette dispersion peut être accélérée lors des travaux du sol, par la contamination des engins de travail (Villate, 2008) ou encore à l'occasion du remembrement de parcelles de vigne occasionnant un transport de sol contaminé. La contamination de parcelles en aval d'un vignoble infecté peut également être due à l'érosion des sols et au ruissellement des eaux de pluie entraînant les nématodes et d'éventuels débris radiculaires infectés (Villate, 2008).

La reproduction de *X. index* est essentiellement parthénogénétique (Villate *et al.,* 2010) et permet à une seule femelle d'engendrer un foyer de nématodes. Si cette femelle est virulifère, un nouveau foyer de maladie peut être engendré. Les adultes et tous les stades larvaires sont susceptibles d'acquérir et de transmettre le virus, mais ils perdent leur virulence lors de la mue (Taylor et Brown, 1997). Le virus ne se multiplie pas dans le nématode, n'influence pas sa reproduction (Das et Raski, 1969) et n'est pas transmissible

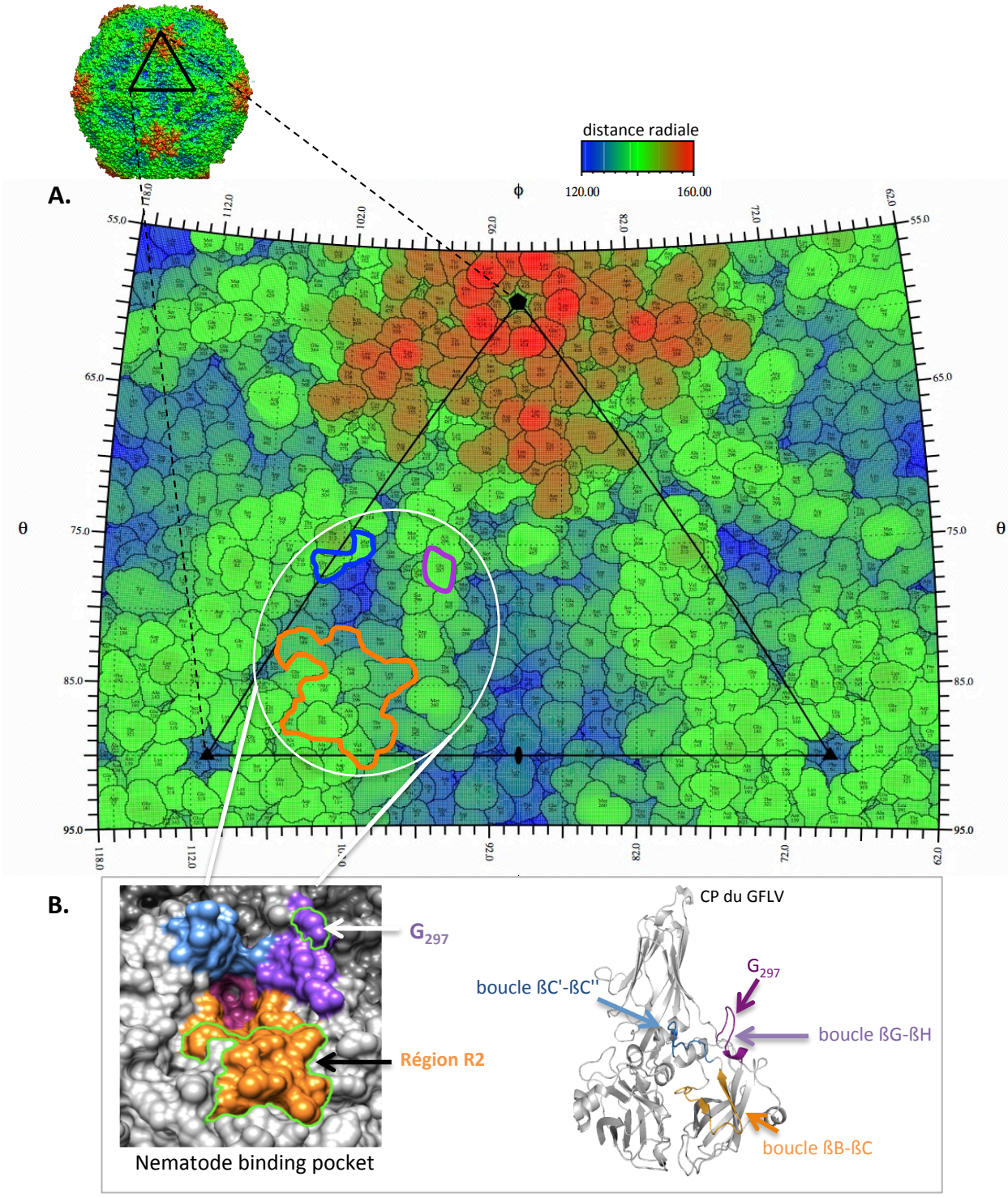


Figure 1.11. (A) Projection 2D des résidus de surface de la capside du GFLV obtenue par *Radial Interpretation of Viral Electron density Maps* (RIVEM) montrant la distance radiale de chaque résidu par rapport au centre de la capside par un code couleur allant du bleu au rouge. L'oval blanc met en évidence la cavité supposée du site d'interaction avec le nématode, bordée de 3 régions influençant la spécificité de la transmission (en orange, bleu et violet, Schellenberger *et al.,* 2011). **(B) Représentation de la surface de la Nematode binding pocket** (NBP) site supposé de reconnaissance du virus par le nématode *X. index*. Les résidus de surface correspondant à la boucle ßG-ßH, à la boucle ßC'-ßC'' et à la boucle ßB-ßC qui entourent la cavité ont été colorés en violet, en bleu et en orange respectivement. Chez le mutant GFLV-G2 les acides aminés de la région R2 ont été remplacés par leurs équivalents ArMV. Le mutant GFLV-TD porte une mutation unique au niveau du résidu Gly_{297} changé en acide aspartique.

aux œufs. Ces caractéristiques ont conduit à établir que la transmission du GFLV s'effectue selon un mode semi-persistant non circulant (Mac Farlane, 2003). Le développement du nématode, de l'œuf à l'adulte, dure 2 à 3 mois en conditions contrôlées favorables mais peut nécessiter plusieurs années en cas de conditions défavorables. En conditions abiotiques défavorables et/ou en l'absence de plantes, les nématodes peuvent rentrer en quiescence avec l'arrêt de toutes les fonctions métaboliques. Le cycle biologique du nématode reprendra si des conditions favorables se présentent à nouveau (Antoniou, 1989). Ceci explique que les nématodes peuvent survivre dans une parcelle en jachère pendant de longues années. En conditions contrôlées, les adultes et les larves de *X. index* peuvent subsister plus de quatre ans dans un sol nu en restant virulifères (Demangeat *et al.,* 2005). L'analyse de la distribution verticale du nématode montre que les effectifs les plus importants se trouvent essentiellement dans la rhizosphère des racines en croissance, entre 50 et 100 cm de profondeur (Villate, 2008) mais des nématodes peuvent été retrouvés jusqu'à plus de trois mètres de profondeur (Demangeat, 2007).

La recherche des déterminants viraux de la transmission des népovirus a permis d'attribuer la spécificité de la transmission à l'ARN2, sans pour autant identifier le gène impliqué (Harrison et Murant, 1977). L'utilisation d'ARN2 recombinants développés à partir des séquences du GFLV et de l'ArMV ont permis de montrer que les gènes codant pour les CP du GFLV et de l'ArMV déterminent la spécificité de transmission par leur vecteurs respectifs (Belin *et al.,* 2001 ; Andret-Link *et al.,* 2004, Marmonier *et al.,* 2010). Pour poursuivre ces travaux, une approche combinant génétique inverse, cristallographie aux rayons X et cryomicroscopie électronique a été réalisée dans le cadre de la thèse de Pascale Schellenberger. Cette approche structurale a conduit à la détermination de la structure atomique de l'isolat de référence GFLV-F13 avec une résolution de 3Å et celle d'un variant naturel faiblement transmis, le GFLV-TD, à 2,7Å (Schellenberger *et al.,* 2010). La CP de l'isolat GFLV-TD présente une mutation restreinte à un seul acide aminé (Gly297) changé en acide aspartique. L'analyse des structures atomiques a mis en évidence, à la surface de la particule de GFLV, une cavité chargée positivement délimitée par trois boucles ßB-ßC, ßG-ßH et ßC'-ßC'' du domaine B de la CP (Schellenberger *et al.,* 2011 ; figure 1.11). Le rôle dans la transmission du GFLV des boucles ßB-ßC et ßG-ßH bordant cette cavité et exposées vers l'extérieur, a été démontré par une série de mutagénèses dirigées (Schellenberger *et al.,* 2010, 2011). La structure cristallographique du GFLV-TD montre qu'il ne diffère du GFLV-F13

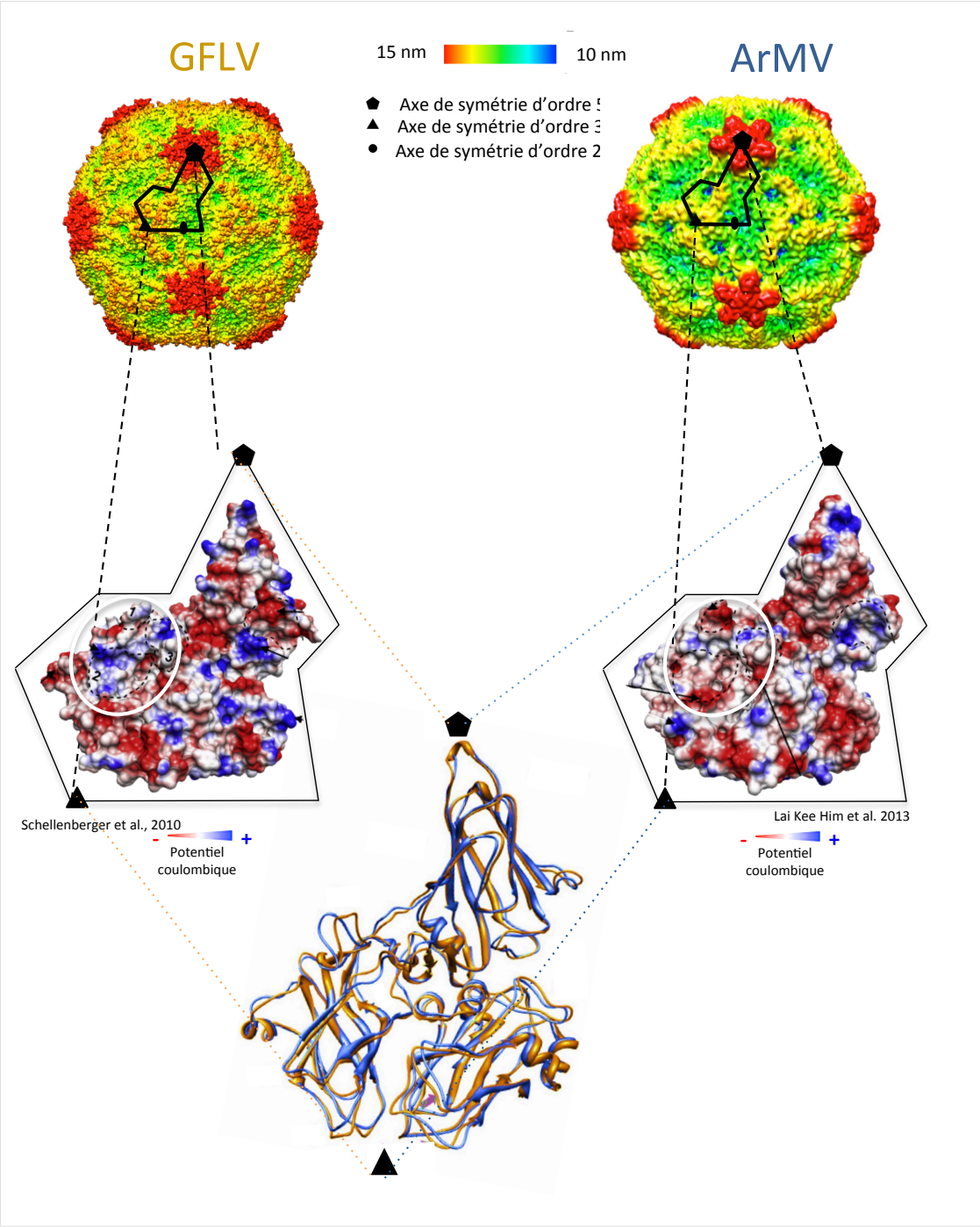


Figure 1.12. Représentation des capsides virales du GFLV et de l'ArMV et comparaison des différences électrostatiques et structurales d'une protéine de capside. Le cercle blanc représente la supposée *Nematode binding pocket,* chargée majoritairement positivement pour le GFLV et négativement pour l'ArMV. La superposition des chaines carbonées des protéines de capside du GFLV (orange) et de l'ArMV (bleu) montre leur organisation structurale très proche.

que par la protubérance apportée par la chaine latérale de l'acide aspartique, qui ajoute une charge négative aux abords de la cavité supposée impliquée dans la transmission. Cette cavité dénommée «*Nematode Binding Pocket* » (NBP ; figure 1.11), serait reconnue par un récepteur présent au niveau de l'appareil alimentaire du nématode, qui n'a pas été identifié à ce jour.

X. diversicaudatum est un autre nématode ectoparasite filiforme et mesure environ 5 mm de long au stade adulte. Contrairement à toutes les autres espèces de *Xiphinema* vectrices de virus qui ont un mode de reproduction parthénogénétique, *X. diversicaudatum* présente un mode de reproduction sexuée. Il possède les mêmes capacités de rétention et de transmission de virus que *X. index* (Mc Namara, 1980). Aucun déterminant exact de la capside de l'ArMV impliqué dans sa transmission n'a été identifié jusqu'à présent. Cependant, la reconstruction d'un modèle de la structure de l'ArMV par cryomicroscopie avec une résolution de 6,5Å montre clairement que la potentielle NBP de l'ArMV est chargée négativement et montre peu de différences de structurales avec celle du GFLV (Lai Lee Him *et al.,* 2013 ; figure 1.12). Chez ce nématode, la région de rétention virale est tapissée de glucides (Robertson et Henry, 1986), mais l'identité exacte du récepteur demeure inconnue à ce jour.

B. Autres modes de transmission

Le GFLV peut être transmis par le pollen et par les graines (Andret-Link *et al.,* 2004 ; Martelli, 2014). Cependant, la dissémination du virus par la graine reste rare du fait du mode de propagation par multiplication végétative des clones viticoles, même si elle a été décrite pour plusieurs népovirus (Oliver et Fuchs 2011). Les graines peuvent être disséminées dans la nature par les consommateurs de raisin (homme, oiseaux, rongeurs), mais c'est majoritairement la production des bois et des plants de vigne par greffage et bouturage de matériel infecté qui est la principale source de propagation de la maladie dans le monde (Martelli, 1993). La maladie peut donc être présente dans des vignobles exempts de nématodes vecteurs. Ceci a été reporté pour le GFLV (Mekuria *et al.,* 2009) ainsi que pour l'ArMV (Celebi-Toprak *et al.,* 2013) aux États-Unis. Cependant, en absence de nématode vecteur, la maladie tend à disparaître spontanément suite à la mort prématurée des ceps infectés et leur remplacement par du matériel sain (Taylor et Brown, 1997).

C. Gamme d'hôtes

Le GFLV possède une gamme d'hôtes naturelle restreinte essentiellement à la vigne en condition naturelle mais ce virus peut être transmis à des plantes adventices (Izadpanah *et al.,* 2003). L'ArMV quant à lui a une gamme plus large et peut infecter 93 espèces de plantes (Murant, 1981) dont des plantes arbustives à petits fruits (Oliver et Fuchs, 2011) comme les framboisiers, qui peuvent servir de foyer primaire d'infection de parcelles viticoles. L'ArMV et le GFLV peuvent être facilement transmis et inoculés mécaniquement à des plantes herbacées (Cadman 1960). En revanche, ils ne sont pas inoculables mécaniquement à la vigne (Walter *et al.,* 2000).

VII. Gestion et lutte contre la maladie

La gestion et la lutte contre la maladie du court-noué diffèrent selon que le vignoble soit infecté ou sain.

1. Cas d'un vignoble infecté

A. Pratiques culturales et lutte contre le nématode vecteur

Après l'identification de la maladie au vignoble, les ceps infectés sont arrachés après dévitalisation, en utilisant un herbicide systémique à base de glyphosate ou de sulfonate pour détruire les racines en profondeur. Les racines sont précautionneusement extraites du sol pour priver les nématodes d'une source d'alimentation infectée résiduelle. Cependant, les nématodes peuvent rester virulifères au moins quatre ans après l'arrachage (Demangeat, 2005) et une jachère d'au moins 7 ans est préconisée (Demangeat, 2007), ce qui peut s'avérer économiquement délicat voire impossible. Pour les vignobles à haute valeur ajoutée comme les zones AOP, ou celles des grands crus (dont la délimitation est très stricte) où la maladie du court-noué est présente, le repos du sol n'est en pratique pas appliqué au-delà de 3 à 4 ans. Outre l'absence de récolte pendant la période de repos, cette pratique conduit généralement au maintien du potentiel infectieux à travers la présence de nématodes virulifères et inexorablement à la contamination des pieds nouvellement plantés (Audeguin, communication personnelle 2010).

Jusqu'en 2007, les populations de nématodes pouvaient être contrôlées par désinfection du sol à l'aide de molécules de synthèse (granules d'aldicarbe) ou de fumigants (méthyl bromide, 1,3-dichloropropene) (Esmenjaud et Bouquet, 2009). Cependant, l'utilisation de fumigants avant la plantation ne réduit que partiellement les populations de nématodes. Les traitements chimiques coûtent chers et ont une efficacité très limitée dans des sols lourds et humides, même lorsque les conditions d'application sont optimales. De plus, la toxicité pour les viticulteurs et la rémanence de ces molécules dans l'eau et les sols (Abawi et Widmer, 2000) ont conduit à leur interdiction totale en Europe (directive 91/414/CEE).

B. La lutte biologique

Des alternatives à la lutte chimique sont en cours d'évaluation. La première est basée sur l'utilisation de plantes connues pour avoir des effets antagonistes vis-à-vis des nématodes. Ainsi, la culture de tagètes (*Tagetes minuta*), de vesce velue (*Viscia villosa*) ou encore de lupins (*Lupinus albus*) permet de réduire la population de nématodes en serre sous conditions contrôlées mais aussi dans une parcelle de vigne fortement contaminée par des nématodes (Villate, 2008 ; Villate *et al.,* 2012). Ces plantes à effet antagoniste font actuellement l'objet d'une expérience multi-sites dans des vignobles français (Olivier Lemaire, communication personnelle). Le mécanisme d'action de ces plantes n'est pas connu pour l'instant mais ces plantes pourraient produire des molécules répulsives ou toxiques pour les nématodes Ces molécules pourraient être des saponines, métabolites secondaires, capables d'inhiber la croissance de pathogènes aériens ou issus du sol. Les trois plantes couvre-sol citées précédemment sont en effet productrices de saponines (Fancis *et al.,* 2002 ; Argentieri *et al.,* 2008, Pensec *et al.,* 2013). Des saponines extraites de l'arbre à savon (*Quillaja saponaria*) ou de gypsophiles additionnées à un milieu aqueux ou à du sol contenant des nématodes ont un effet létal vis-à-vis de *X. index* et *X. diversicaudatum* (Fischer *et al.,* 2011, Pensec *et al.,* 2013). Cependant, l'efficacité de cette molécule au vignoble n'a été que très peu étudiée (Pensec *et al.,* 2013) et des tests en champs réalisés au Chili montrent plutôt un effet synergique des saponines avec d'autres molécules issues de *Q. saponaria* (San Martin et Magunacelaya, 2005). Les saponines se retrouvent déjà dans certains pesticides commerciaux (Moldstim, Pavstim, QL AgriTM) et utilisées seules, elles présentent l'avantage d'être beaucoup moins délétères pour la microflore présente sur la vigne, notamment pour les levures qui sont indispensables au processus de fermentation.

L'introduction de symbiotes de plantes dans le sol est également à l'étude pour limiter l'impact des nématodes sur les racines. L'utilisation de *Trichoderma* (Darago *et al.,* 2013) ou de rhizobactéries (Aballay *et al.,* 2012) diminue le nombre de galles formées sur les racines et réduit la population du nématode *Xiphinema index*. La mycorhization de *Glomus intraradices* au niveau des racines d'un porte-greffe viticole induit une diminution du nombre de galles présentes et réduit la population de nématodes dans le sol environnant. L'utilité de cette approche pour lutter contre la maladie du court-noué n'est cependant pas connue.

C. La prémunition

La prémunition consiste à introduire une souche de virus hypo-virulente dans un jeune plant de vigne, afin de minimiser l'impact d'une infection ultérieure par une souche virulente (Walter, 1988). Sur hôtes herbacées, la prémunition avec de l'ArMV-S hypovirulent permet une protection croisée contre le GFLV (Huss *et al.,* 1989). Dans un vignoble infecté, l'implantation de vignes prémunies avec les souches hypo-virulentes de GFLV-GHu et d'ArMV-Ta retarde de quatre ans le développement d'une infection par le court-noué présent dans la parcelle. Le taux d'infection des ceps passe de 90% d'infection chez les non prémunis à 19% d'infection chez les prémunis avec l'isolat GHu. Cependant, des effets négatifs sur le rendement et la qualité des moûts ont été observés chez les vignes prémunies dès le début de l'expérimentation, ce qui rend beaucoup moins attrayant ce moyen de contrôle de la maladie pour les viticulteurs (Komar *et al.,* 2008).

D. Le phénomène de résistance

Si une résistance aux népovirus n'a pour l'instant pas été mise en évidence chez les espèces de *Vitis*, une résistance à *Xiphinema index* a été identifiée chez plusieurs espèces comme *V. arizonica, V. candicans, V. rufotomentosa, V. solonis* et *M. rotundifolia* (Bouquet *et al.,* 2000). L'ensemble de des résistances ont été décrites et leurs intérêts discutés par Olivier et Fuchs (2011). *Muscadinia rotundifolia*, une variété également résistante au phylloxera, produit peu de bois, s'enracine mal et présente une mauvaise aptitude au greffage, ce qui en fait un porte-greffe peu robuste (Ollat *et al.,* 2011). Ceci a conduit à la production d'un porte-greffe, issue d'un croisement entre *Muscadinia rotundifolia* (NC 184-4), *Vitis vinifera* (Cabernet-Sauvignon x Alicante Henri Bouschet) et du porte-greffe 140 Ruggeri. Ce porte-

greffe « Nemadex Alain Bouquet» est inscrit au Catalogue Officiel des variétés depuis mai 2011. Ce porte-greffe ne concède pas une résistance au virus du court noué et n'empêche pas le passage du virus du porte-greffe au greffon, mais retarde l'apparition des symptômes d'une dizaine d'années (Esmenjaud et Bouquet, 2009 ; Laimer *et al.,* 2009 ; Ollat *et al.,* 2011). Cependant, le porte-greffe Nemadex AB présente certains défauts agronomiques comme une faible résistance au sol sec et calcaire, ainsi qu'une faible vigueur conférée au greffon. L'étude génétique de la résistance au nématode chez *Vitis arizonica* a permis d'isoler un locus de caractère quantitatif majeur (QTL pour quantitative trait locus) qui a été nommé Xiphinema index Resistance 1 (Xu *et al.,* 2008). L'introduction de ce QTL dans d'autres variétés permettra peut être la sélection de porte-greffes résistants aux nématodes (Hwang *et al.,* 2010).

En l'absence de gène de résistance, l'induction de la résistance à ces deux virus est apparue à travers le développement et l'étude de plantes génétiquement modifiées. Des plantes transgéniques exprimant la protéine $2C^{CP}$ du GFLV et de l'ArMV ont été générées pour conférer une résistance dérivée du pathogène (Hemmer *et al.,* 2009 ; Gambino *et al.,* 2005 ; Maghuly *et al.,* 2006) ; des miARN ciblant le gène de la $2C^{CP}$ ont été testés dans des embryons somatiques de vigne (Jelly *et al.,* 2012) ; et des séquences virales ont également été introduites sous forme de structure tige-boucle afin d'activer les voies de l'ARN silencing (Gambino *et al.,* 2010). Une autre stratégie a été développée par Nölke *et al.* (2009), avec l'introduction de la séquence d'un fragment simple brin d'anticorps (scFV) ciblant la CP du GFLV et de l'ArMV dans le génome de *N. benthamiana*, conférant une résistance au GFLV et une diminution de la charge virale d'ArMV. Une stratégie similaire a été développée dans notre laboratoire avec l'introduction de séquences codantes pour un Nanobody dirigé contre le GFLV dans des plantes de *N. benthamiana.* Ces plantes transgéniques sont résistantes à l'infection par le GFLV (Hemmer *et al.,* 2016, voir chapitre 6).Il s'avère que la plupart des études de résistance au court-noué ont été réalisées sur hôtes herbacées. Si cette technologie est applicable à la vigne, l'inoculation reproductible du virus à la vigne et l'évaluation de la résistance s'avèrent délicates. L'inoculation mécanique de la vigne est problématique et l'agro-infiltration des vignes avec des clones cDNA infectieux du GFLV n'est pour le moment pas totalement fonctionnelle. Le greffage d'une variété de vigne transgénique saine sur une vigne ou une plante herbacée infectée pour permettre le passage du virus au greffon est une opération lourde et délicate, dont le taux de réussite est

très variable. De plus, le test en plein air de plantes transgéniques en France reste un débat houleux pour l'instant et légalement difficile à mener, alors qu'il permettrait d'évaluer l'efficacité de la résistance suite à une transmission naturelle de différents variants représentant la population virale du vignoble.

E. Stratégies curatives à partir d'une plante infectée

Il n'existe pour le moment aucun traitement curatif de la maladie du cout-noué au vignoble. Toutefois, il est possible d'obtenir des individus sains à partir d'une plante mère malade en s'appuyant sur la thermothérapie ou la chimiothérapie, le microbouturage et la culture de méristème ainsi que sur le microgreffage méristématique.

La thermothérapie est l'une des méthodes curatives la plus couramment utilisée pour traiter les viroses (Panattoni *et al.,* 2013). Elle consiste à faire pousser les vignes infectées pendant plusieurs mois à haute température (entre 35°C et 38°C) et à régénérer des plantes saines à partir de fragment méristématiques. Cette stratégie s'avère efficace contre le GFLV qui est sensible à la chaleur (Panattoni et Triolo, 2010) et a notamment permis de sauver de la disparition le Klevener de Heilingenstein Bass (Legin, 1981). Le traitement par chimiothérapie (ribavirine) permet l'assainissement de 94% des plantes infectées par le GFLV et permet l'obtention de vigne saine à partir de matériel infecté (Weiland *et al.,* 2004). La ribavirine, analogue de synthèse de la guanosine, est incorporée au milieu de culture *in vitro* servant à la régénération des vignes et inhibant la réplication du virus.

Ces deux techniques peuvent être associées au microbouturage ou au microgreffage de méristèmes. Les méristèmes sont formés de cellules indifférenciées situées au cœur des bourgeons qui se multiplient pour donner les différents tissus d'une plante. Ces structures sont généralement indemnes de virus (Limasset et Cornuet, 1950) et permettent la régénération de plantes saines à partir d'une plante infectée par microbouturage ou microgreffage. Le microbouturage de méristèmes est basé sur la multiplication végétative de méristèmes *in vitro.* Cette technique consiste en un prélèvement du méristème déposé dans un milieu complexe aseptique permettant la régénération complète d'une plante fille saine, génétiquement identique à la plante mère infectée. Le microgreffage méristématique consiste à prélever l'apex méristématique d'une plante virosée et de le micro-greffer sur un hypocotyle produit à partir d'un semis de vigne ou d'un embryon somatique (Gambino *et al.,* 2009). Cette technique permet l'assainissement de plantes infectées par le GFLV (Youssef *et al.,* 2009) car le GFLV est thermosensible et les méristèmes des vignes sont indemnes de

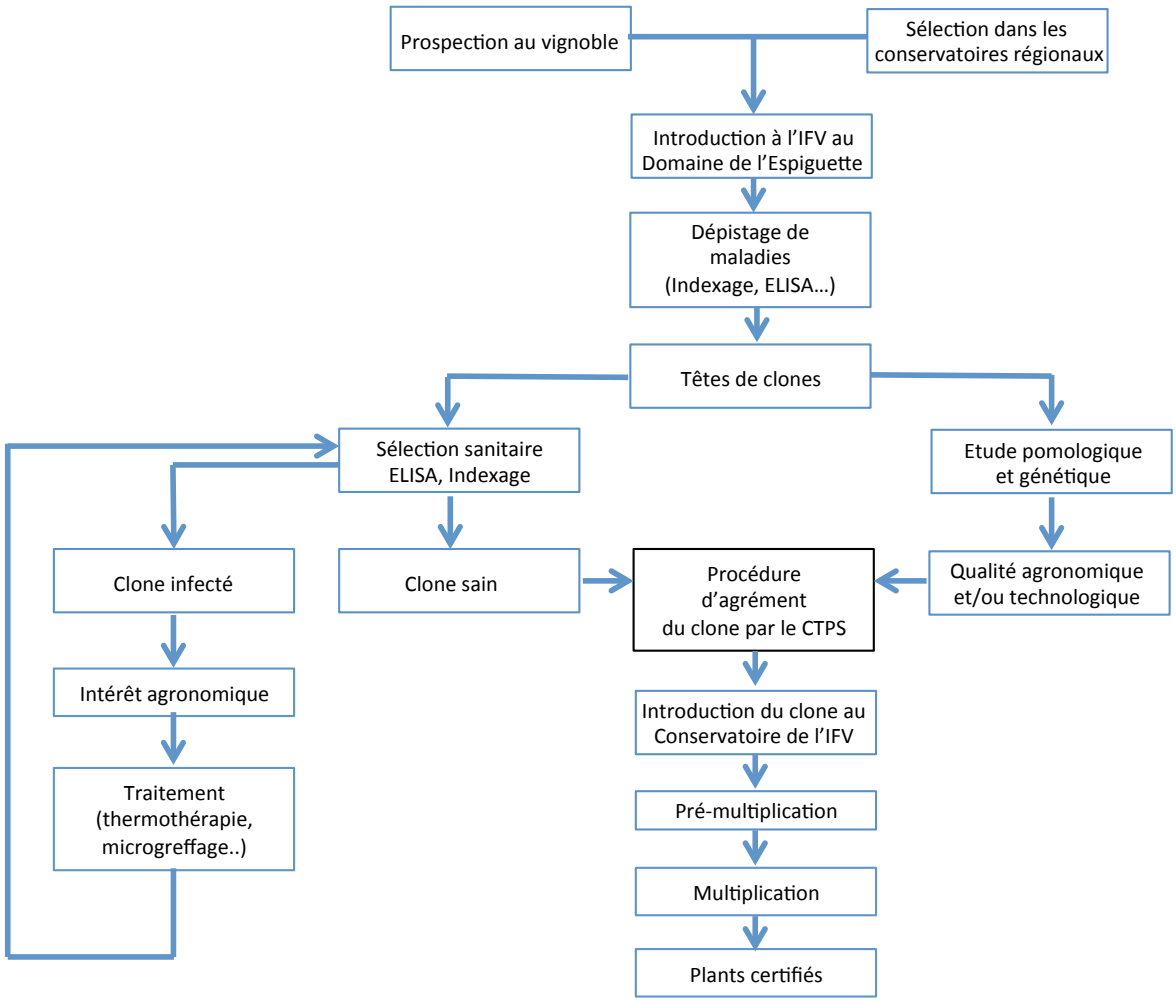


Figure 1.13. Schéma de la sélection sanitaire et clonale française, mises en place par l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) et le Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS), pour lutter contre la dissémination de la maladie du court-noué et proposer à la viticulture des plants de vigne certifiés sains.

virus. Cependant, cette méthode délicate est longue et coûteuse et nécessite des infrastructures et un personnel hautement qualifié. Elle n'est, pour le moment, envisagée que pour des variétés menacées de disparition et/ou des clones d'intérêt agronomique élevé. Le personnel de l'institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), au Grau du Roi, maîtrise cette technique en associant une période dite de semi-thermothérapie (environ 34°C) au microgreffage de méristème apical.

2. Cas d'un vignoble sain

Dans le cas d'un vignoble exempt de la maladie, la lutte repose sur le contrôle sanitaire du matériel végétal durant les phases de multiplication (vignes-mères de porte-greffes et de greffons, pépinières). L'article 3 de la Directive 2009/128/CE indique d'ailleurs que la désinfection du matériel agricole et la plantation de végétaux certifiés est le premier moyen prophylactique pour éviter la propagation de maladies.

A. La sélection clonale

La sélection clonale est basée sur la sélection sanitaire d'une part, agronomique et technologique d'autre part et la multiplication de clones aux caractéristiques culturales connues et indemnes de viroses. Cette sélection est un processus long qui se déroule en plusieurs étapes (figure 1.13). L'IFV, basé au Grau du Roi, est un des deux centres officiels de ce type de sélection. C'est également le conservatoire national des variétés et des clones, et conserve à ce titre le matériel initial. Le centre de sélection de l'IFV a été choisi car les sols sableux du Domaine de l'Espiguette ne contiennent ni phylloxera ni nématodes vecteurs du court-noué et permettent de cultiver des vignes de porte-greffe et greffons indemnes de ces deux maladies. Le réseau national INRA-IFV-Partenaires comporte également 170 conservatoires régionaux dans l'ensemble des bassins viticoles pour préserver la diversité génétique intra-variétale des cépages (Yobregat, communication personnelle). L'ensemble de ces conservatoires recèle plus de 20 000 clones comprenant au moins 105 variétés. Ainsi, après une prospection dans les vignes ou une sélection dans les conservatoires régionaux, les clones aux propriétés les plus intéressantes (par exemple, la résistance aux ravageurs, le rendement élevé…) sont introduits au domaine de l'Espiguette. Des analyses génétiques et agronomiques y sont ensuite menées pour confirmer les aspects intéressants du clone

identifié. Si ce clone est indemne de viroses graves et règlementées, une procédure d'agrément est engagée auprès de la section vigne du Comité Technique Permanent de Sélection (CTPS) et le clone pourra alors être diffusé sous un numéro officiel. La sélection d'un clone jusqu'à son agrément coûte environ 50 000 euros et nécessite une dizaine d'années. Aujourd'hui on estime que les clones émanant des programmes de sélection représentent 95% des plantations annuelles (Audeguin, communication personnelle, 2010). Si des prospections sont toujours en cours pour trouver des cépages naturellement capables de résister à la maladie du court-noué ou d'en atténuer la sévérité, aucun clone ayant ces propriétés n'a été identifié à ce jour.

B. La sélection sanitaire

Aujourd'hui les viticulteurs achètent les plants en faisant confiance à leur fournisseur quant à l'état sanitaire du matériel végétal. En France, la Section de Sélection et de Contrôle des Bois et Plants de Vigne a été créée en 1946 pour répertorier les producteurs de bois de multiplication des porte-greffes et greffons et des pépiniéristes. La France suit les directives de l'European and Mediaterranean Plant Protection Organisation pour le programme de certification, d'importation et d'exportation du matériel végétal. Ces directives détaillent la marche à suivre pour la production de matériel végétal et les différentes procédures de dépistage du matériel infecté. Selon l'arrêté du 20 septembre 2006 « relatif à la sélection, à la production, à la circulation et à la distribution des matériels de multiplication végétative de la vigne », les pépiniéristes sont dans l'obligation de contrôler leurs parcelles de vignes mères porte-greffes et greffons au plus tard 5 ans après la plantation, puis tous les 10 ans pour les vignes-mères produisant du matériel certifié. Le coût annuel de ces prélèvements et de leurs analyses est estimé à 3.5 millions d'euros (source IFV). Les greffons et porte-greffes commerciaux « de catégorie certifiée » doivent être exempts de maladies pour éviter la contamination des parcelles et la transmission de viroses par greffage. Ces mesures impliquent 50 pays et visent à limiter la dispersion de maladies *via* du matériel contaminé. Si certains pays producteurs ont des règles bien établies et respectées, notamment en Europe, ce n'est pas le cas partout dans le monde et certains pays ne possèdent pas de tels schémas de certification. Dès lors, compte tenu d'une législation peu homogène entre pays et l'absence d'une législation au niveau mondial, il est compréhensible que du matériel infecté soit toujours propagé à l'heure actuelle.

Comme il n'existe pour le moment aucun moyen de lutte satisfaisant contre la maladie du court-noué, seul l'utilisation de matériel végétal sain permet de limiter la dispersion de cette maladie. Par conséquence, la détection du virus est donc un domaine d'investigation majeur dans la lutte contre la propagation de la maladie. Un des tests de diagnostic couramment utilisé de la maladie du court-noué est un test sérologique, le test DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Ces tests sont réalisés par des laboratoires agréés, selon les recommandations de la Méthode Officielle (Détection des Virus de la Vigne par la technique sérologique DAS-ELISA – Méthode vv./04/05 version b) développée par le Laboratoire de la Santé des Végétaux (laboratoire national de référence rattaché à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ; ANSES) mais aussi par des laboratoires travaillant sur les maladies virales de la vigne. Le laboratoire de l'IFV où j'ai effectué une partie de ma thèse est accrédité COFRAC (Comité français d'accréditation) pour la détection des virus de la vigne par la technique sérologique DAS-ELISA, et propose une prestation de diagnostic pour les virus du court-noué de la vigne.

Introduction

Chapitre II. Diagnostic des maladies à virus de la vigne

	Nom	Symptômes causés	Mesures sanitaires	Technique de diagnostic
Organismes de quarantaine non présents dans l'UE	***Xyllella fastidiosa*** (bactérie)	Jaunissement et dessèchement des feuilles, dessèchement des rameaux, mort du cep 1 à 5 ans après l'infection	interdiction d'import de ceps, racines ou terre contaminés	microscopie, indexage, ELISA et PCR
	Margarodes (cochenille)	déclin de vigueur progressif, les pousses deviennent grêles et plus courtes, entrainant la mort progressive des sarments puis de la plante entière	interdiction d'import de ceps, racines ou terre contaminés	identification morphologique par microscopie, observation des symptômes
	TRSV, ToRSV, PRMV, BLMoV (népovirus américains)	jaunissement foliaires, raccourcissement des entrenoeuds, réduction du nombre de grains par grappe, déclin progressif	interdiction d'import de ceps, racines ou terre contaminés	indexage
	Xiphinema americanum* et *californicum, Longidorus diadecturus (nématodes)	attaque des racines, vecteurs des népovirus américains	interdiction d'import de ceps, racines ou terre contaminés	identification morphologique par microscopie
Organismes de quarantaine présents dans l'UE	***Daktulosphaira vitifoliae*** (Puceron du phylloxera)	formation de galles sur les feuilles, nodosité et tubérosités sur les racines, blessures permettant l'entrée d'autres pathogènes entrainant la mort rapide des pieds infectés	surveillance du matériel végétal (porte greffe et greffons), production de plant dans un sol sablonneux composé à >65% de sable fin	identification morphologique par microscopie, observation des symptômes
	Phytoplasme de la Flavescence dorée	jaunissement ou rougissement des feuilles, enroulement, défaut d'aoutement, port du cep en pagode	surveillance par les viticulteurs et services de protection des végétaux (FREDON, DRAAF), certification sanitaire, insecticide contre la cicadelle vectrice, déclaration et arrachage obligatoire d'un cep contaminé	ELISA et ISEM
	Xylophilus ampelinus (bactérie)	dessèchement des feuilles, formation de crevasses au niveau des rameaux, coulure	surveillance des vignes-mères et pépinières, désinfection du matériel de taille, destruction des bois de taille, traitement à l'eau chaude (50°C) pendant 45 minutes des plants et boutures	PCR suivie d'une analyse microscopique avec immunofluorescence indirecte
Virus réglementés	**GFLV, ArMV** (népovirus)	jaunissement foliaires, raccourcissement des entrenoeuds, réduction du nombre de grains par grappe, déclin progressif	certification sanitaire, repos du sol des parcelles de vignes mères, pépinières et parcelles de production	indexage et ELISA
	GLRaV-1 et 3 (Ampélovirus)	jaunissement ou rougissement des feuilles, enroulement des feuilles	certification sanitaire, surveillance des parcelles de vignes-mères et des pépinières	RT-PCR et ELISA

Tableau 2.1. Organismes nuisibles de la vigne et les mesures phytosanitaires prise à leur encontre après leur diagnostic. D'après le site de référence de l'European and Mediaterranean Plant Protection Organisation (www.eppo.int) et celui de l'école d'ingénieur de Montpellier (www.supagro.fr)

Chapitre II. Diagnostic des maladies à virus de la vigne

La production, le transport, le commerce et l'échange de matériel végétal peuvent entrainer la dissémination d'organismes nuisibles pour l'économie et l'agriculture. La communauté internationale a donc établie des règles pour éviter la propagation de matériel infecté et la dissémination de maladies. Ainsi, dans les laboratoires de contrôle sanitaire des plantes, les tests de diagnostic servent à la mise en évidence de pathogènes dans le but d'identifier des organismes nuisibles réglementés et des organismes de quarantaine. Ces organismes sont répertoriés par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) et la Food and Agricultural Organisation of the United Nation (FAO). Les organismes nuisibles de la vigne englobent des organismes de quarantaine comme les népovirus américains et leurs nématodes vecteurs (directive 2000/29/CE) ainsi que des organismes réglementés, qui ne sont pas de quarantaine, comme le GFLV et l'ArMV (directive 1968/193/CEE, Tableau 2.1).

Chez la vigne, les organismes réglementés et de quarantaine sont détectés par différentes méthodes de diagnostic présentées dans ce chapitre. Ces tests sont incontournables pour réduire la présence de ces pathogènes dans le matériel initial, certifier l'état sanitaire du matériel végétal avant plantation et établir la présence de la maladie dans des ceps déjà implantés au vignoble. Compte tenu des mesures souvent drastiques à prendre après la mise en évidence de l'infection d'un cep (dévitalisation, arrachage...), un diagnostic clair et fiable est indispensable. Les paramètres importants d'une méthode de diagnostic sont sa spécificité, sa sensibilité et la largeur de son spectre de détection, mais la rapidité d'obtention du résultat et le coût peuvent également être pris en compte par les utilisateurs et surtout par les clients, lorsque ces tests sont proposés en prestation. Selon l'utilité et la finalité du test, différentes approches de dépistage peuvent être envisagées.

Actuellement, le principal outil de diagnostic de la maladie du court-noué est un test sérologique, le DAS-ELISA. Ce test est utilisé par les laboratoires travaillant sur la maladie du court-noué mais aussi par des laboratoires agréés, qui doivent suivre les recommandations de la Méthode Officielle (Détection des Virus de la Vigne par la technique sérologique DAS-ELISA – Méthode vv./04/05 version b) développée par le Laboratoire de la Santé des Végétaux (ANSES). Les laboratoires agréés proposent ces analyses en prestation pour les viticulteurs et les pépiniéristes. Le secteur du diagnostic est très actif et en constante évolution. L'arsenal des différentes méthodes de diagnostic se développe et peut être basé

sur des approches biologiques, des méthodes sérologiques ou moléculaires. Les tests sérologiques ont évolué avec la maitrise de la production et les possibilités de modifications des anticorps. L'essor de la biotechnologie, la connaissance et le séquençage du génome des virus ont donné lieu au développement de nombreuses méthodes moléculaires ciblant les génomes viraux. Pour le diagnostic des agents viraux, ces méthodes peuvent être appliquées à différents organes de la plante, comme les feuilles, les racines et le bois, à différentes périodes de l'année. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients qui sont discutés en fin de ce chapitre.

I. Les méthodes biologiques

1. Observations des symptômes

La multiplication d'un virus dans la vigne se traduit souvent par l'apparition de symptômes caractéristiques (voir chapitre 1). La description et l'analyse de ces symptômes peuvent servir à eux seuls à identifier la maladie et la nature de l'agent causal. L'observation de symptômes sur vigne dans les pépinières ou dans les parcelles en exploitation est effectuée depuis les temps les plus anciens par les opérateurs du monde viticole. Cette prospection permet d'identifier les pieds de vignes touchés par des viroses aux symptômes caractéristiques et d'éliminer les pieds atteints, assurant un contrôle primaire de la maladie.

Cependant, cette approche présente très vite des limites. Comme décrit précédemment (chapitre 1), certains symptômes provoqués par une maladie virale peuvent être aisément confondus avec des symptômes résultant de carences minérales ou de troubles physiologiques (Galet, 1977). Ainsi, une simple observation des symptômes ne permet pas d'attester de la présence de la maladie car les symptômes ont une expression variable en fonction de l'isolat viral, du cépage et des conditions pédoclimatiques. De plus, certains virus ne causent pas de symptômes apparents, comme ceux du complexe du bois strié, pour lesquels les symptômes n'apparaissent qu'après greffage sur des sélections sensibles. La seule observation des symptômes ne permettant pas un diagnostic fiable ; il est alors nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes de diagnostic.

Variété indicatrice	Maladie identifiable
Vitis rupestris	Court-noué, marbrure, mosaïque étoilée, rupestris stem pitting
Vitis vinifera Cabernet franc, Pinot noir	Enroulement
Kober 5BB (*Vitis bertandieri* x *Vitis riparia*)	Kober stem grooving
LN 33 (Couderc 1613 X *Vitis berlandieri*)	Corky bark, LN33 stem grooving
Vitis riparia Gloire de Montpellier	Mosaïque des nervures
110 R (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*)	Nécroses des nervures
Vitis vinifera Mataro ou Mission	Enroulement

Tableau 2.2. Liste des vignes indicatrices permettant l'identification de la présence de maladies virales par indexage. L'indexage est une méthode de diagnostic biologique qui consiste à placer un greffon de la plante à tester sur une bouture d'une variété indicatrice qui exprimera de façon très nette les symptômes spécifiques de la virose recherchée (d'après Martelli, 1993).

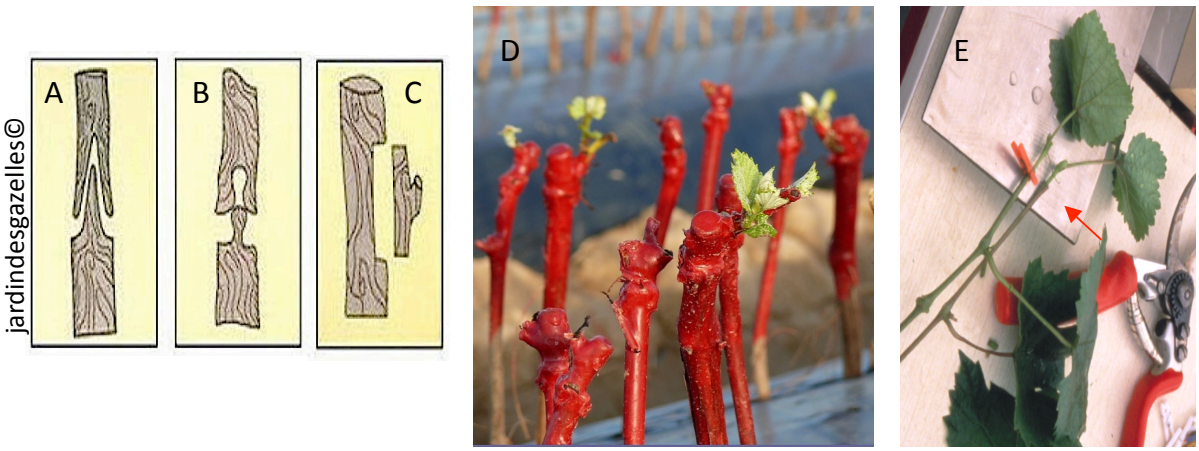


Figure 2.1 Technique de greffage (A) en fente **(B)** en oméga **(C)** en écusson. Les points de greffe indiqués par une flèche rouge, sont généralement protégés par **(D)** de la cire pour le greffage ligneux ou par **(E)** une pince pour le greffage en vert pour augmenter la prise du greffage, avant que la vigne ne soit plantée en pépinière d'indexage.

2. Indexage biologique

L'indexage est une méthode de diagnostic biologique qui consiste à tester la présence de virus en greffant une bouture de la plante à tester sur une sélection de vignes dite «indicatrices». Si un virus est présent, la variété indicatrice exprimera de manière évidente les symptômes de la virose recherchée. Pour réaliser cette méthode, des cépages, porte-greffes et hybrides de vignes exprimant des symptômes caractéristiques de chaque maladie ont été identifiées (Tableau 2.2, Martelli, 1993). Cette méthode est non spécifique et permet d'identifier une maladie, indépendamment du virus ou du sérotype viral présent dans la plante testée. Elle présente l'avantage de révéler la présence d'isolats viraux virulents, peu virulents ou à l'état latent. L'indexage constitue à ce jour une des méthodes officielles sur laquelle s'appuie, en France, la section vigne du Comité Technique Permanent de Sélection (CTPS) pour la certification sanitaire du matériel végétal et l'agrément des clones.

Généralement, la plante à tester est assemblée avec une bouture de l'indicateur soit par greffage en fente, par greffage en oméga ou encore par greffage en écusson, cette dernière technique correspondant au greffage d'un œil ou d'un morceau d'écorce de la plante à tester (écusson) sur la tige de la variété indicatrice (figure 2.1 A, B, C). Le point de greffe est ensuite protégé par de la cire (figure 2.1.D) et les assemblages sont placés à 30°C pour permettre la formation de cals au niveau du point de greffe. Après acclimatation, les greffes soudées sont placées en pépinières d'indexage (figure 2.2.A) et l'apparition de symptômes est observée sur une période de 2 à 3 ans (figure 2.2.B). La période de lecture des symptômes a été réduite à des périodes allant de 6 à 18 mois, par la mise au point d'une méthode dite « greffe / bouture herbacée » développée à l'INRA de Colmar (Walter *et al.,* 1990). Cette méthode, également appelée greffage en vert, consiste à réaliser une greffe avec du matériel végétal vert, en sève montante. Dans ce cas, un greffage en fente ou en écusson est réalisé sur une variété indicatrice non lignifiée, dite verte. Les assemblages sont ensuite placés en chambres climatiques pour favoriser la prise de la greffe. Après 3 à 4 semaines de culture, les assemblages sont progressivement adaptés dans une chambre d'indexage permettant l'extériorisation des symptômes, sur une période beaucoup plus courte que celle du greffage classique.

Figure 2.2. (A) Pépinière d'indexage pour le dépistage de virus et maladies virales dans le cadre de la sélection sanitaire de la vigne **(B) Symptômes d'enroulement sur plante indicatrice** *Vitis vinifera* Pinot noir.

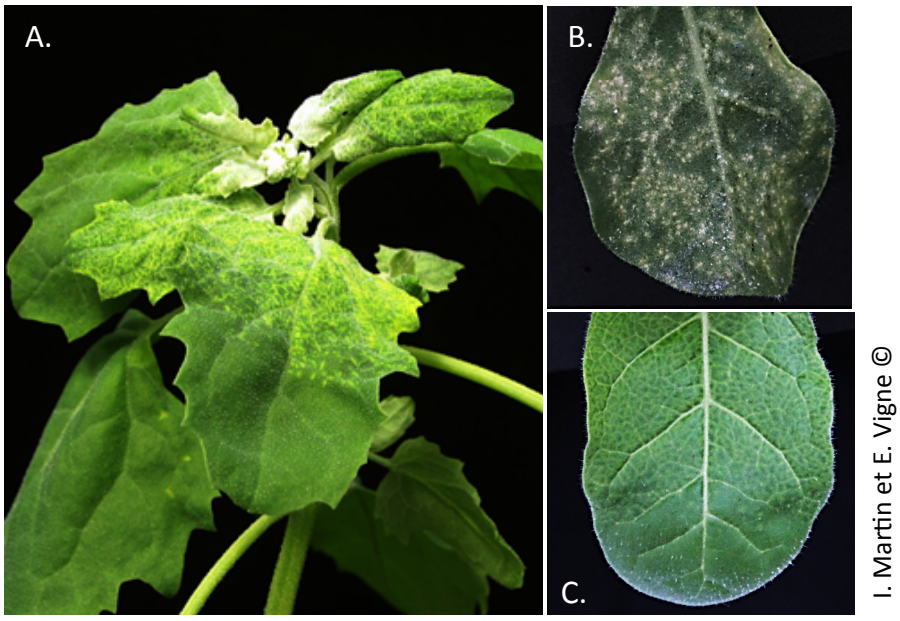


Figure 2.3. Symptômes causés par le *Grapevine fanleaf virus,* agent de la maladie du court-noué, sur *C. quinoa* (A) et sur *N. occidentalis* (B et C).
La maladie cause des gauffrements des feuilles et des tâches chlorotiques jaunes sur *C. quinoa*. Sur *N. occidentalis* elle provoque des tâches nécrotiques sur feuilles inoculées et des éclaircissements des nervures sur feuilles systémiques.

3. Inoculation mécanique de plantes herbacées

Les virus responsables de la maladie du court-noué de la vigne peuvent être inoculés à une gamme d'hôtes herbacées comme *Chenopodium quinoa* ou *Nicotiana benthamiana*, à partir de virus purifiés ou d'extraits de plantes infectées. Dans des conditions satisfaisantes (température, croissance et luminosité), ces hôtes herbacées expriment, au niveau des feuilles apicales, des symptômes caractéristiques de la maladie du court-noué qui se traduisent par une mosaïque ou des tâches jaunes (figure 2.3. A, B et C ; Walter *et al.*, 1990). L'inoculation mécanique à des hôtes herbacés est également possible pour certains clostérovirus comme le GLRaV-2, le GVA et le GVB, transmissibles mécaniquement à *Nicotiana clevandii* et/ou *Nicotiana occidentalis* à partir d'extraits de vignes infectées (Ghanem-Sabanadzovic *et al.,* 2000 ; Agran *et al.,* 1990, Martelli, 2014). Ces virus induisent respectivement des lésions nécrotiques au niveau des feuilles et un éclaircissement ou un jaunissement des nervures (Martelli, 1993).

II. Observations par microscopie

1. Microscopie optique

En microscopie optique, la recherche des cordons endo-vasculaires au niveau des bois de vigne est le test de laboratoire le plus anciennement utilisé pour confirmer le diagnostic de maladie du court-noué (figure 2.4. A et B). Les vignes atteintes par la maladie développent des filaments ressemblants à des fils de verre disposés en files radiales dans les vaisseaux ligneux (Vuittenez, 1954). Cette observation est pratiquée sur des coupes de 50 µm de matériel lignifié prélevé au niveau du deuxième entre-nœud à partir de la base du sarment. Pour certains génotypes sensibles, comme le Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*), l'apparition de ces cordons précèdent l'apparition des symptômes. Cependant, si leur présence atteste de la maladie du court-noué, leur absence n'est pas synonyme de l'absence de la maladie (Galet, 1977). Cette méthode, relativement aléatoire, n'est plus utilisée actuellement.

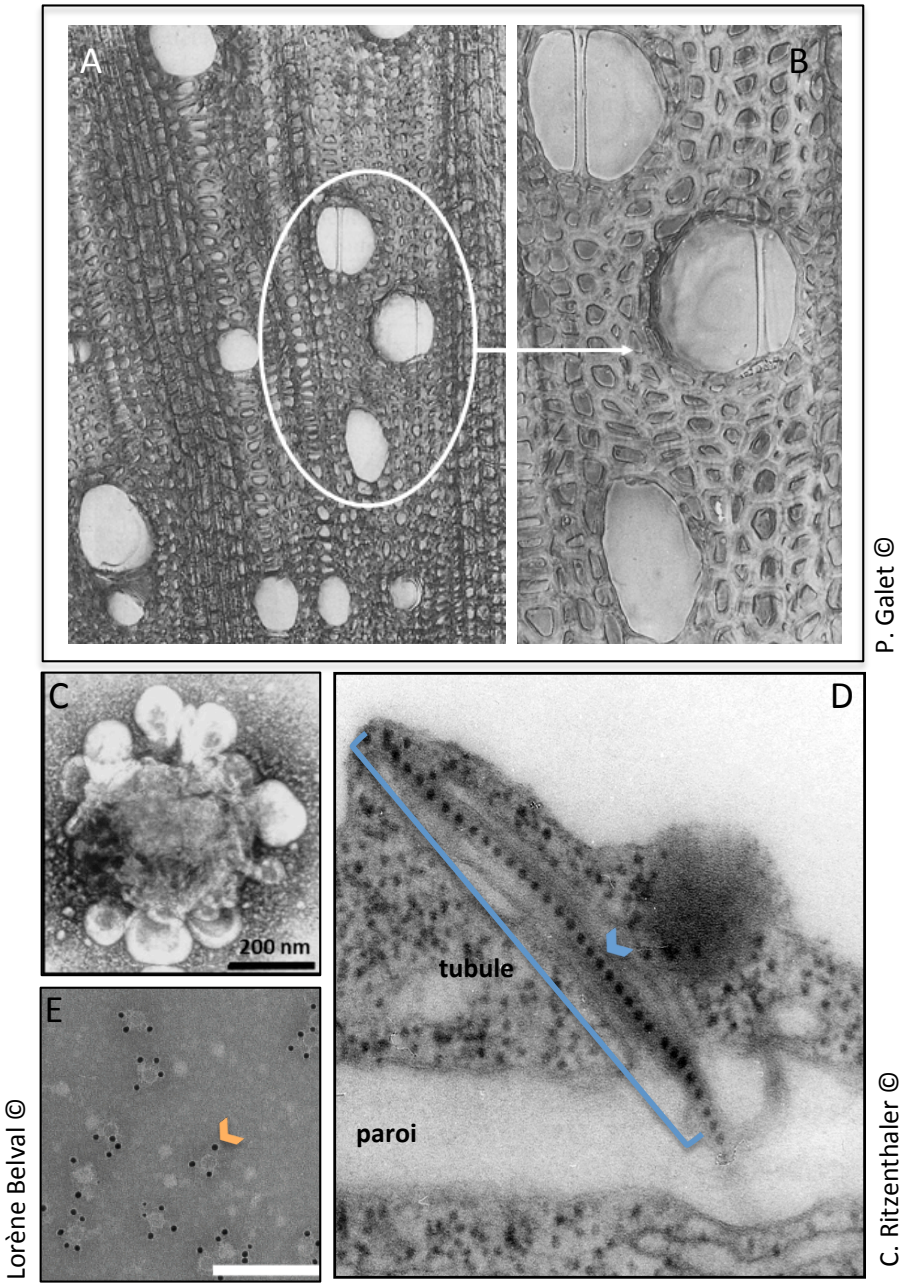


Figure 2.4. Modifications anatomiques engendrées par la maladie du court noué, se traduisant par l'apparition **(A)** de cordons endocellulaires dans le bois d'un sarment avec **(B)** un grossissement plus important de deux cordons. Ces cordons ont pour origine une enclave anormale formée dans une cellule du méristème. La présence du virus, peut être indiquée par la présence d'un compartiment viral à la périphérie du noyau **(C)** mais peut aussi **(D)** s'observer dans une cellule infectée, ici à l'intérieur d'un tubule formé par les protéines de mouvement $2B^{MP}$ qui permet le passage des virions (indiqués ici par une tête de flèche bleue) d'une cellule infectée à une cellule saine au travers de la paroi végétale. La présence du virus peut aussi être mise en évidence par des anticorps couplés à l'or colloïdal **(E)** indiqués ici par une tête de flèche jaune.

2. Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) fournit tout d'abord des informations sur la morphologie et les dimensions des particules virales ; chaque famille de virus ayant une taille et une forme caractéristique (icosaédriques, bâtonnets plus ou moins longs et rigides). Les phytovirus peuvent être visualisés dans différents organes d'une plante et la présence de certains agents viraux induit des modifications des cellules hôtes. Par exemple, dans le cas du GFLV, la présence de virus se traduit par l'apparition d'un compartiment viral, issu d'une prolifération de membranes nouvellement induites et dérivées du réticulum endoplasmique (RE) qui s'organisent en rosette (Ritzenthaler *et al.,* 2002) (figure 2.4.C). Les particules virales peuvent même être observées à l'intérieur des tubules formés par la protéine de mouvement $2B^{MP}$, permettant le passage des virions d'une cellule infectée à une cellule saine voisine au travers de la paroi végétale (figure 2.4.D). L'observation de tissus issus de matériel végétal infecté, nécessite des techniques particulières de préparation des échantillons. L'échantillon est fixé par déshydratation puis inclus dans une résine. Des coupes ultrafines de cette résine sont réalisées puis montées sur une grille de microscopie pour l'observation. L'utilisation d'anticorps marqués (le plus souvent conjugués à des billes d'or) dirigés contre les protéines virales permet de mettre en exergue la présence de virus dans un échantillon (figure 2.4.E). De même, l'*Immuno Sorbent Electron Microscopy* (ISEM) permet la capture de particules virales grâce à des anticorps spécifiques fixés sur la grille de microscopie, révélant ainsi la présence de virus dans un échantillon (Debrick, 1973). Cette technique a été utilisée pour détecter la présence du GFLV dans un échantillon infecté (Russo *et al.,* 1980) et dans son nématode vecteur *X. index* (Roberts et Brown*,* 1980).

III. Les méthodes moléculaires

Les méthodes de diagnostic moléculaire se sont développées depuis les années 80 avec l'avènement du séquençage favorisant l'accès aux génomes viraux, et permettant de les utiliser comme cible en diagnostic. Ces techniques sont de plus en plus sensibles et en constante évolution.

1. Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire est basée sur l'hybridation d'une sonde moléculaire marquée (radioactive ou fluorescente) développée pour être complémentaire à une séquence virale d'intérêt. Par des techniques de type dot-blot ou northern blot, cette technique permet la détection de 100 pg de GFLV soit 10 fois moins qu'en DAS-ELISA (Fuchs *et al.,* 1999). Elle a également été développée pour d'autres virus infectant la vigne comme le GLRaV-3, le GVA et le GVB et permettent de détecter ces virus jusqu'à un seuil de 30 à 125 picogrammes (Walter *et al.,* 1998). Les techniques d'hybridation moléculaire conduisent à une proportion de faux positifs plus faible que celle des techniques PCR car il n'y a pas d'amplification d'acides nucléiques, seulement une amplification du signal de détection (Wiedbrauk et Farkas, 1995).

2. Les méthodes dérivées de la PCR

La technique de PCR (Saiki *et al.,* 1985) permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN, grâce à l'utilisation d'une enzyme, l'ADN polymérase DNA dépendante et de deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques encadrant une séquence d'intérêt. La réaction se déroule en 20 à 35 cycles dans un thermocycleur avec la répétition d'étapes de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces avec les brins matrices et d'une élongation de la séquence des amorces permettant de couvrir la taille du fragment à amplifier. Les amplicons obtenus sont analysés sur gel d'agarose et coloration au bromure d'ethidium. Les techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) permettent la mise en évidence des virus induisant la maladie du court-noué dans les plantes hôtes mais aussi dans les nématodes vecteurs.

A. La RT-PCR

La majorité des viruses de plantes étant des virus dont le génome est composé d'ARN. La première étape de cette méthode consiste en une rétro-transcription de l'ARN viral en un ADN complémentaire (ADNc) pour procéder à l'amplification par PCR, d'où son nom de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). La quantité et la qualité d'ARN obtenu après extraction et la conception d'amorces ciblant une région génomique fortement conservée, sont les deux étapes critiques de cette technique. Le séquençage des

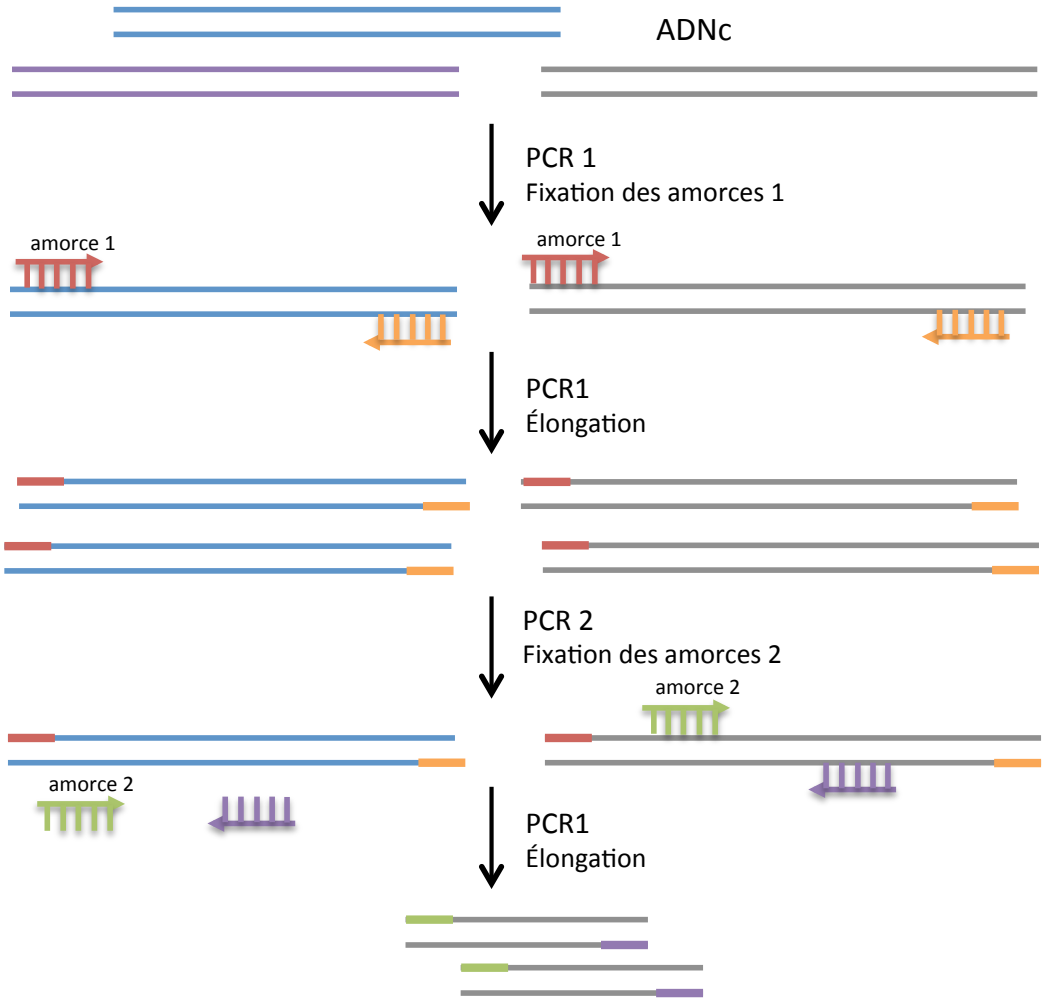


Figure 2.5. La nested RT-PCR permet l'amplification spécifique de fragments à l'aide de deux paires d'amorces complémentaires à la séquence d'intérêt. Si le premier couple d'amorce peut engendrer l'amplification de plusieurs fragments suite à une fixation aspécifique, une deuxième paire d'amorces « nichées » dans celui-ci permettra l'amplification du fragment d'intérêt lors d'une deuxième PCR. Il est en effet moins probable que l'un des produits de PCR indésirables contienne les séquences cibles de la deuxième paire d'amorce.

fragments obtenus après la PCR permet de caractériser les souches virales et de mettre en évidence les différences de séquences entre isolats viraux. Cette technique décrite pour la première fois à partir d'échantillons de *C. quinoa* infectés (Rowhani *et al.,* 1993) est fréquemment utilisée à l'INRA de Colmar pour la recherche des virus de la maladie du court-noué chez la vigne (Vigne *et al.,* 2008, 2009) et la recherche de virus dans les nématodes (Demangeat *et al.,* 2004 ; Demangeat *et al.,* 2005) avec des primers ciblant le gène $2C^{CP}$. Cette technique s'applique à l'ensemble des virus de la vigne dès qu'une fraction, ou la totalité du génome du virus est connue.

B. La nested-PCR

La nested-RT-PCR (ou PCR gigogne) permet l'amplification de fragments à l'aide de deux paires d'amorces complémentaires à la séquence d'intérêt. Une première paire d'amorces permet l'amplification d'un fragment sur lequel s'hybridera une deuxième paire d'amorces « nichées » dans celui-ci lors d'une deuxième PCR (figure 2.5). Cette technique permet l'identification de virus responsables de l'enroulement en utilisant des amorces dégénérées ciblant le gène heat shock protein 70 homologue (HSP70), ainsi que des virus du complexe du bois strié avec des amorces dégénérées ciblant le gène codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante (Dovas et Katis, 2003).

C. L' ImmunoCapture Reverse Transcription PCR

Une adaptation du protocole de RT-PCR est l'*ImmunoCapture Reverse Transcription* PCR (IC-RT-PCR). Dans ce cas, les particules virales sont capturées dans une plaque ELISA à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus. Après la décapsidation du virus et la rétrotranscription de l'ARN viral, une PCR est réalisée sur l'ADNc obtenu, avec des amorces complémentaires d'une région spécifique du génome viral. Cette technique permet par exemple la détection du GVA dans la cochenille vectrice de la maladie du bois strié, ainsi que dans les feuilles ou le bois de vignes infectées par le GLRaV-3 ou le GFLV (Minafra *et al.,* 1994 ; Belin *et al.,* 2001 ; Vigne *et al.,* 2004) . Cette méthode permet également d'accéder au génome du virus sans avoir à extraire les ARN totaux de l'échantillon, étape très délicate à partir de la vigne.

D. L'analyse RFLP

L'analyse par *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) est basée sur la digestion des fragments PCR par des enzymes et l'analyse des profils de restriction générés. Le choix judicieux de combinaisons d'enzymes de restrictions permet ainsi de discriminer et de comparer les isolats les uns par rapport aux autres, afin d'identifier si l'échantillon présente des infections par un unique ou de multiples variants. Ainsi, Vigne *et al.,* 2004 ont montré que plus de 30% des vignes sont naturellement infectées par au moins deux variants de GFLV au vignoble. L'analyse de la longueur des fragments d'ADN viraux permet d'identifier les souches virales présentes dans un échantillon et même de discriminer différents isolats de GFLV (Vigne *et al.,* 2004 ; Fattouch *et al.,* 2005). Une approche de RT-PCR-RFLP avec des amorces ciblant le gène de capside $2C^{CP}$ suivie d'une analyse RFLP avec le site de restriction *Sty*I, permet la caractérisation de l'isolat viral présent dans un seul nématode virulifère, dans un lot de 3000 nématodes avirulifères (Demangeat *et al.,* 2004). Une méthode d'IC-RT-PCR-RFLP permet la détection simultanée et différenciée de l'ArMV et du GFLV avec une seule paire d'amorces ciblant le gène $2B^{MP}$. La différenciation entre les deux virus est possible grâce à un site de restriction *SphI* présent chez le GFLV mais absent chez l'ArMV (Wetzel *et al.,* 2002).

E. La real time quantitative RT-PCR (rt RT-qPCR)

La RT-PCR quantitative en temps réel (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR* ; rt RT-qPCR) est une évolution majeure de la technologie PCR. À partir d'un prélèvement d'un échantillon de vigne infecté, l'ARN viral est extrait puis rétrotranscrit en ADNc. Des amorces ciblant des régions spécifiques du génome permettent l'amplification de fragments d'ADNc par PCR. Cette méthode mesure la quantité d'ADN synthétisée pendant le début de la phase exponentielle de la PCR, par incorporation d'une molécule fluorescente apportée par une sonde (Higuchi *et al.,* 1993). Les thermocycleurs sont équipés pour mesurer en continue la fluorescence émise par la réaction. Les valeurs sont normalisées par rapport à des gènes de référence et le profil obtenu est comparé aux profils de témoins positifs et de témoins sains. Cette technique est la plus sensible des méthodes PCR et permet de quantifier le génome viral présent dans un échantillon infecté. Cependant, les amorces, les témoins et les gènes de référence doivent être méticuleusement choisis. Les amorces choisies pour identifier la présence de virus doivent cibler une région hautement conservée par les différents isolats

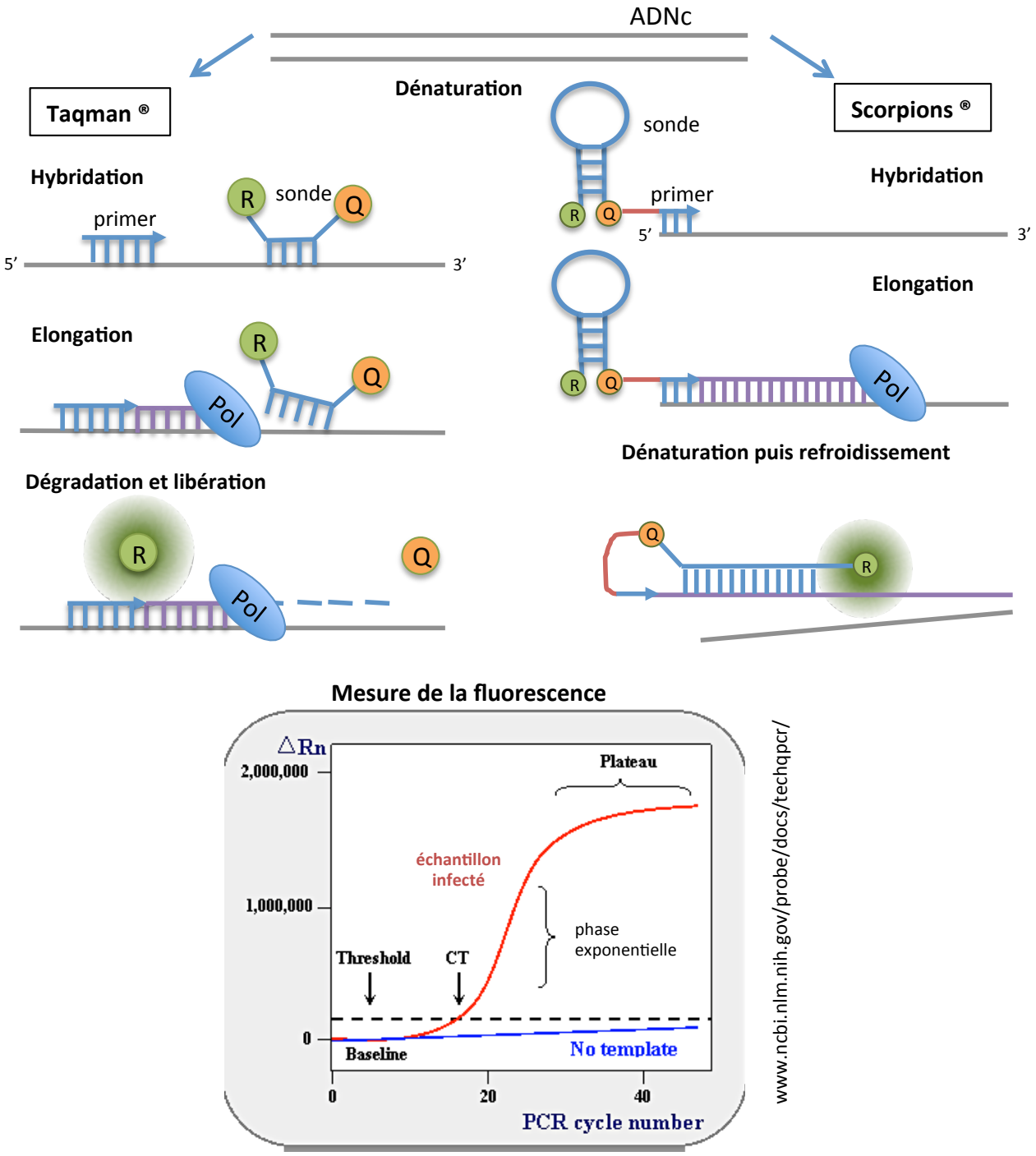


Figure 2.6. Principe des sondes Taqman® et Scorpions® utilisées en Low Density Array (LDA) et qPCR. La technique de LDA repose sur les mêmes principes et techniques que la qPCR à la différence que les amorces et les sondes Taqman® sont déjà présentes sous forme déshydratées dans la plaque de qPCR. Les deux sondes fonctionnent de façon similaires. Elles sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome rapporteur et à leur extrémité 3' par un quencheur (Q) qui inhibe l'émission du fluorochrome rapporteur (R) lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, le fluorochrome rapporteur sera ainsi séparé du quencher, et émettra un signal proportionnel au nombre de rapporteur non quenché et donc au nombre de fragments d'intérêt amplifiés. Les amorces et sondes utilisées ciblent des régions du génôme viral et la fluorescence mesurée permet donc de révéler la présence du virus dans un échantillon.

viraux, et l'expression des gènes de référence ne doit pas être modulée pendant l'infection. Dans le cas du GLRaV-3, trois séquences virales (ORF1a, le gène codant pour la protéine de capside et le 3'UTR) et trois gènes cellulaires (actine, α-tubuline et GAPDH) permettent de discriminer les échantillons infectés des échantillons sains avec robustesse (Bester *et al.,* 2014). Osman *et al., (*2007 et 2008) ont quant à eux développés la rt RT-PCR pour permettre la détection des virus de l'enroulement et ceux du complexe du bois strié chez la vigne, en utilisant comme gène de référence, le gène codant pour l'ARN ribosomique 18S.

Pour le diagnostic de la maladie du court-noué, Cepin *et al.,* (2010) ont développé un test TaqMan® RT-qPCR avec des sondes ciblant un motif conservé du gène $2A^{HP}$ du GFLV. Les sondes TaqMan® (figure 2.6) sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome rapporteur et à leur extrémité 3' par un « quencheur », qui inhibe l'émission du fluorochrome rapporteur lorsqu'il est à proximité. Au cours de la PCR, la sonde hybridée à sa séquence cible sera hydrolysée par l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase pendant la phase d'élongation. Le fluorochrome rapporteur sera ainsi séparé du « quencher », et émettra un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées et donc au nombre de fragments d'intérêt amplifiés. La sensibilité de ce type de test a été comparée à celle de l'ELISA en testant en parallèle des dilutions d'échantillons infectés par les deux méthodes. Il apparaît que cette technique est 1000 fois plus sensible que l'ELISA (Cepin *et al.,* 2010). Cette sensibilité permet la détection de virus en phase précoce de l'infection et représente un atout majeur dans la lutte contre la dissémination de matériel végétal infecté. La rt RT-PCR a également permis la détection du GLFV et la quantification de ce virus dans un seul individu *X. index* à l'aide de sonde Scorpion® ciblant le gène $2C^{CP}$ (Finetti-Sialer et Ciancio, 2005). La sonde Scorpion® est constituée d'une séquence en tige-boucle (figure 2.6). L'émission du fluorochrome rapporteur fixé à son extrémité 5' est inhibée par le quencheur fixé en 3'. Pendant la phase d'amplification, la sonde s'hybride à la séquence complémentaire de l'ADN ciblé, ouvrant la tige-boucle et permettant l'émission de fluorescence qui pourra alors être mesurée, permettant de quantifier le pathogène d'intérêt.

3. Les techniques de détection multiple

Afin de diagnostiquer la présence de différents virus présent dans un même cep de vigne, plusieurs méthodes de détection polyvalentes ont été développées, même si la grande diversité des virus pouvant infecter la vigne peut être un obstacle majeur dans le développement de ces techniques.

A. La RT-PCR multiplex

La RT-PCR multiplex (M-RT-PCR) permet la mise en évidence de plusieurs virus dans un échantillon, grâce à un mélange d'amorces spécifiques. Neuf virus de la vigne ont été détectés simultanément par cette méthode dont le GFLV et l'ArMV (Gambino et Gribaudo, 2006). Un test basé sur la multiplex-RT-qPCR a été développé par Osman *et al.,* (2013) pour la détection simultanée de trois virus du complexe du bois strié, le GVA, le GVB et le GVD et montre la même sensibilité et spécificité que les singleplex-qPCR qui permettent la détection individuelle de chaque virus. Un test similaire, permettant la détection de 5 virus de la vigne (ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 et GFkV) a été développé par Lopez-Fabuel et ses collaborateurs (2013). Ce test est 10 000 fois plus sensible que l'ELISA et permet la mise en évidence la présence de virus dans des échantillons diagnostiqués négatifs en ELISA.

B. L'approche de Low Density Array (LDA)

La low density array (LDA) a été développée en utilisant les sondes utilisées en real-time TaqMan® RT-PCR déshydratées déposées au préalable dans les puits des plaques de qPCR (figure 2.6). Ce type de plaques précoatées permet une prise en main rapide avantageuse dans le cas de nombreux échantillons à tester. Sur une plaque, elle permet de tester 1 à 8 échantillons infectés avec 11 à 380 combinaisons d'amorces différentes. La LDA permet de tester la présence de plusieurs virus simultanément à partir d'un même échantillon, en utilisant des sondes marquées par des fluorochromes de spectre d'émission différents pour chaque séquence cible. Cette méthode a été comparée à la RT-PCR classique et à la TaqMan® RT-PCR pour la détection de virus de vigne (Osman *et al*., 2008). Les résultats montrent que les techniques de TaqMan® RT-PCR et de LDA sont aussi efficaces que la RT-PCR classique et que treize virus de la vigne de la vigne ont pu être diagnostiqués par cette technique, dont le GFLV (Osman *et al*., 2008).

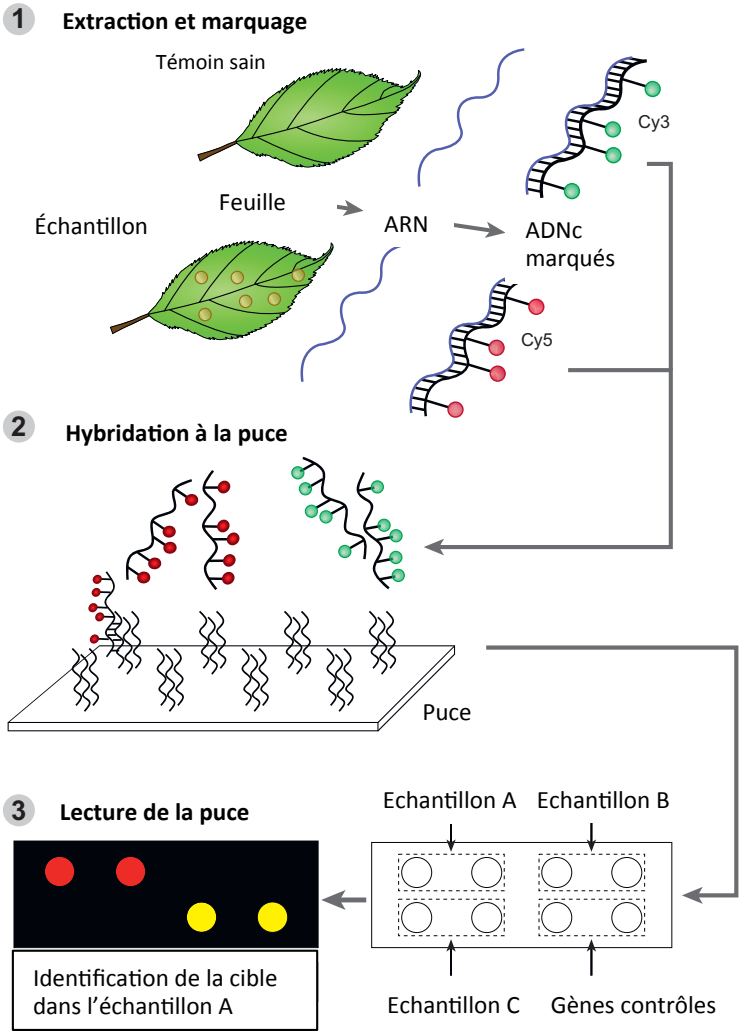


Figure 2.7. Principe du microarray (d'après Boonahm *et al.*, 2007). **(1)** Après extraction des ARN totaux à partir d'extrait végétal et rétrotranscription, les ADNc obtenus sont marqués à la Cyanine 3 ou 5 puis **(2)** sont déposés sur une puce où sont fixées des sondes non marquées ciblant différentes séquences du génome d'intérêt. Seuls les fragments d'ADNc complémentaires à ces sondes pourront s'y hybrider, donnant un profil fluorescent spécifique à chaque puce **(3)**.

	Famille	Type d'ARN ciblé	Technique	Référence
Virus à ARN				
Grapevine Syrah virus-1	Tymoviridae	ARN db	454	Al Rwahnih *et al.*, 2009
Grapevine virus F	Betaflexiviridae	ARN db	Illumina	Al Rwahnih *et al.*, 2012
Grapevine Pinot gris virus	Betaflexiviridae	petits ARN	Illumina	Giampetruzzi *et al.*, 2012
Virus à ADN				
Grapevine Red blotch virus	Geminiviridae	ARN db	Illumina	Al Rwahnih *et al.*, 2013
Grapevine vein clearing virus	Caulimoviridae	petits ARN	Illumina	Zhang *et al.*, 2011
Grapevine geminivirus	Caulimoviridae	petits ARN	Illumina	Seguin *et al.*, 2014
Viroïde				
Grapevine hammerhead viroid like RNA	Avsunviroidae	petits ARN	Illumina	Wu *et al.*, 2012
Grapevine latent viroid	Avsunviroidae	petits ARN	Illumina	Zhang *et al.*, 2014

Tableau 2.3. Virus et viroïdes émergeants infectant la vigne, découverts par Next-Generation Sequencing. Adapté de Wu *et al.*, 2015.

C. Microarrays et macroarrays

Après extractions d'ARN totaux à partir d'un échantillon végétal et rétrotranscription, les ADNc obtenus sont marqués à la Cyanine 3 (fluorescence verte) ou Cyanine 5 (fluorescence rouge). Ces ADNc marqués sont ensuite déposés sur une puce sur laquelle sont fixées des sondes spécifiques non marquées qui peuvent couvrir la totalité du génome d'intérêt. Chaque partie de la puce contenant une seule sonde, la cartographie de la fluorescence permet d'identifier les fragments d'ADNc complémentaires aux séquences cibles. (figure 2.7 ; Brown *et al.,* 1999). La cartographie de fluorescence de l'échantillon sera comparée à un profil témoin (positif et négatif) pour l'établissement d'un diagnostic. Cette technique permet de mettre en évidence un grand nombre de virus différents pour un même échantillon. Engel *et al.* (2010) ont développé une puce composée de 570 sondes oligonucléotidiques ciblant 44 virus infectant la vigne, dont le GFLV, qui permet d'identifier simultanément la présence de ces virus à partir d'un seul échantillon. Des puces de plus grande taille pouvant être observées à l'œil nu, dénommées macroarrays, élaborées à partir d'une membrane de nylon, ont été développées selon le même principe. Cette technique a permis la détection de 38 virus infectant la vigne à partir d'une puce unique, dont le GFLV et l'ArMV (Thompson *et al.,* 2014).

D. Next Generation Sequencing (NGS)

Cette méthode permet de mettre en évidence, sans à priori, l'ensemble des virus présents dans une plante infectée. Elle a permis la découverte de 6 virus et de deux viroïdes infectant la vigne (Wu *et al.,* 2015 ; Tableau 2.3). Pour le phytodiagnostic, la technologie de NGS repose sur différentes stratégies (Massart *et al.,* 2014) dont la première consiste à l'extraction et au séquençage des ARN ou ADN totaux d'un échantillon. Les analyses bioinformatiques réalisées permettent la recherche de séquences virales sur la base de comparaison à des génomes séquencés et référencés dans des bases de données publiques. Dans ce cas, les séquences issues de l'hôte prédominent et la faible proportion de séquences correspondant à l'agent pathogène peut poser problème pour son identification.

D'autres stratégie consistent à d'abord enrichir l'échantillon en composés exogènes en isolant les particules virales, les ARN double brin (ARNdb) qui sont les structures réplicatives

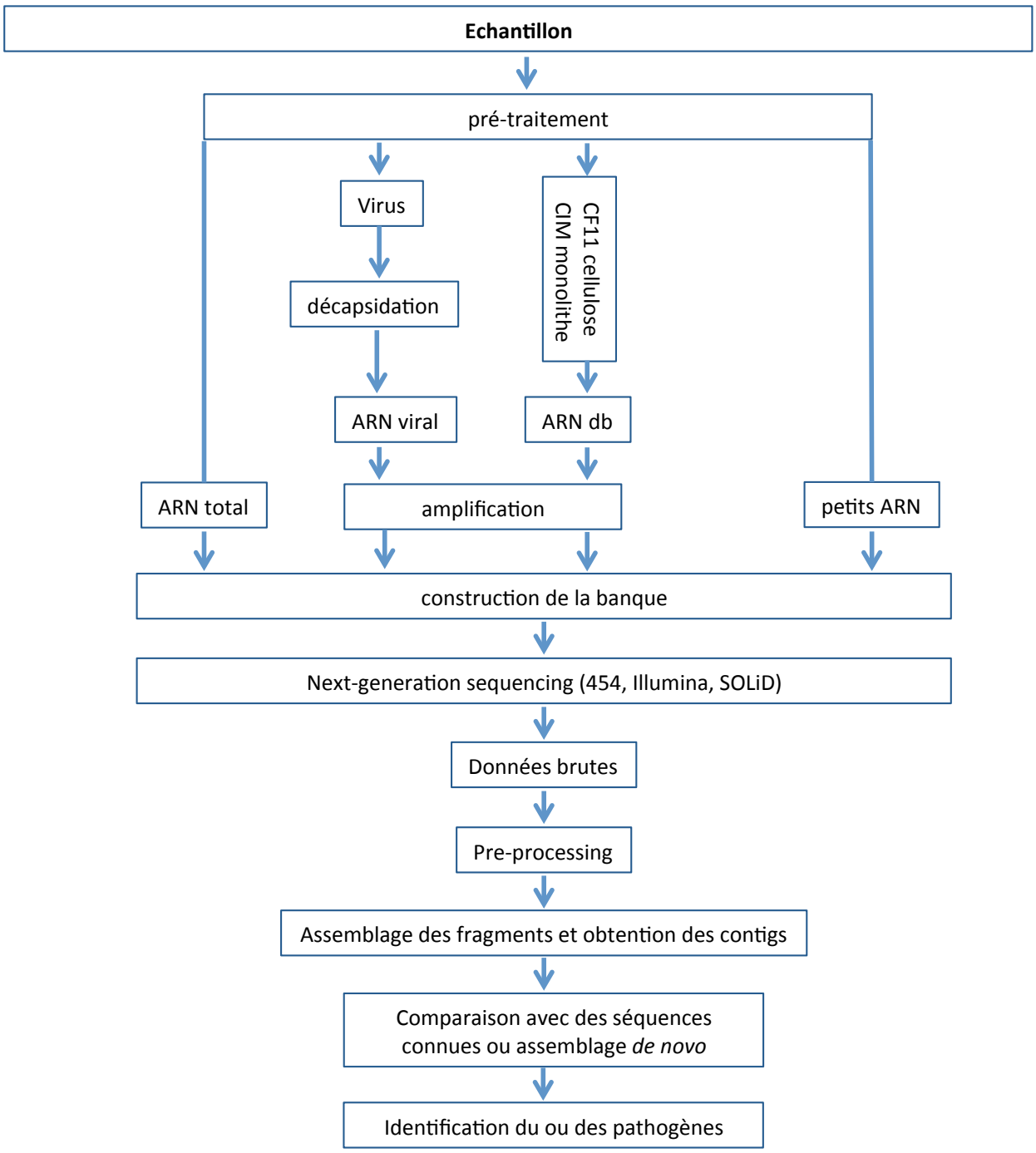


Figure 2.7. Stratégies de Next Generation Sequencing à partir d'un échantillon d'intérêt. Il existe différentes techniques de préparation des échantillons et de séquençage, mais toutes suivent les mêmes grandes étapes. Adapté de Wu *et al.*, 2015.

des phytovirus à ARN simple brin ou les petits ARN et en particulier les ARN interférents (siARN) impliqués dans les mécanismes de défense antivirale. Il existe plusieurs technologies de NGS (454, Illumina, SOLiD) et si chacune utilise une biochimie, une préparation des échantillons et une méthode de séquençage différentes, elle suivent globalement les mêmes étapes (figure 2.7). Lors de la préparation de l'échantillon, des adaptateurs sont fixés à l'ARN ou à l'ADN ayant été préalablement fragmenté par traitement chimique ou enzymatique. Les différents fragments sont ensuite séquencés selon les différentes techniques. Après un premier processing informatique qui consiste à éliminer les adaptateurs et les séquences de basse qualité, les séquences obtenues sont assemblées en contigs en utilisant des logiciels informatiques, sur la base de comparaison à des génomes séquencés et référencés dans des bases de données publiques ou peuvent être aussi assemblées « *de novo* », sans l'utilisation de séquences de référence. Les virus connus sont identifiés lorsque les contigs montrent une similarité de séquence élevée (généralement > 90 % de similarité et 85 % de couverture) avec un virus connu (Wu *et al.,* 2015). Quand un contig présente une relativement faible homologie avec un virus connu, le contig peut représenter un nouveau virus, qui ne peut alors qu'être assigné taxonomiquement seulement au niveau d'une famille virale.

Pour le diagnostic des virus de la vigne, le séquençage d'ARNdb a servi à l'étude du virome d'un vignoble sud-africain à partir de 44 pieds de vigne sélectionnés au hasard (Coetzee *et al*., 2010). Il a permis de montrer la présence de trois virus connus (le GLRaV-3, le GVA et le *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*) ainsi que du *Grapevine virus E* (GVE) qui n'avait jamais été rapporté dans ce pays jusqu'alors. De plus en plus d'études de NGS se basent sur le séquençage des siARN. Ces siARN sont générés suite à un mécanisme de défense antivirale de l'hôte, basé sur le clivage des ARNdb viraux (Obbard *et al.,* 2009) et représentent un pourcentage intéressant (30%) des petits ARN d'un plante infectée (Wu *et al.,* 2015). Cette approche est d'ailleurs la plus largement représentée dans la mise en évidence de nouveaux virus infectant la vigne (Tableau 2.3, Wu *et al.,* 2015). Lors d'une étude réalisée sur trois ceps de vignes slovaques (Glasa *et al.,* 2014) le séquençage des siARN produits (21-24 nt) a révélé que 8% des siARN identifiés étaient d'origine virale. Parmi ces ARN interférents, des séquences similaires à des virus connus (ArMV, GFLV, GLRaV-1 et 3) ont été identifiées par cette méthode et leur présence a été confirmée par DAS-ELISA ou RT-PCR. En plus de ces virus, une recherche par BLAST a montré la présence d'un virus récemment décrit, le *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) qui n'avait pas été diagnostiqué dans

les vignobles tchèques et slovaques jusqu'alors. Ce virus avait d'ailleurs été identifié pour la première fois par cette méthode dans les vignobles italiens (Giampetruzzi *et al.,* 2012) et plus récemment par séquençage Illumina d'ARN totaux provenant de vignes françaises (Beuve *et al.,* 2015). Ce type de séquençage a également permis de montrer la présence dans les vignobles français, d'un virus décrit pour la première fois en Italie en 2000, le *Grapevine redglobe virus* (GRGV) (Beuve *et al.,* 2015).

IV. Les méthodes sérologiques

Contrairement aux méthodes moléculaires, les méthodes sérologiques cibles généralement des protéines virales et majoritairement les protéines de capsides. Les tests sérologiques ont d'abord été développé en conditions liquides ou semi-liquides (tests de précipitation ou d'agglutination) et ont ensuite évolué vers des supports solides comme les plaques ELISA ou les membranes de nitrocellulose. Tous utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux produits après immunisation d'animaux.

1. Les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Les techniques immunologiques de dépistage reposent sur la reconnaissance spécifique d'épitopes par des anticorps dirigés contre les virus ou les pathogènes en général. Elles mettent en jeu des immunoglobulines de type G (anticorps polyclonaux et monoclonaux) le plus souvent dirigés contre la protéine de capside du virus d'intérêt. Les immunoglobulines (Ig ; figure 2.8) sont formées de deux chaines lourdes (ou H pour *heavy*) et de deux chaines légères (ou L pour *light*) composées respectivement de quatre ou de deux domaines stabilisés par des ponts disulfure. Chaque domaine est constitué de feuillets β antiparallèles. Le domaine de reconnaissance de l'antigène est composé de deux domaines variables V des chaines lourdes et légères, appelés respectivement VH et VL. La partie constante des deux chaines lourdes (CH2 et CH3) constitue le fragment constant de l'Ig nommé Fc.

Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes antigéniques pour lesquels ils présentent des affinités variables. Les IgG sont produits après immunisation d'un animal à sang chaud (en général un lapin ou une souris) avec des

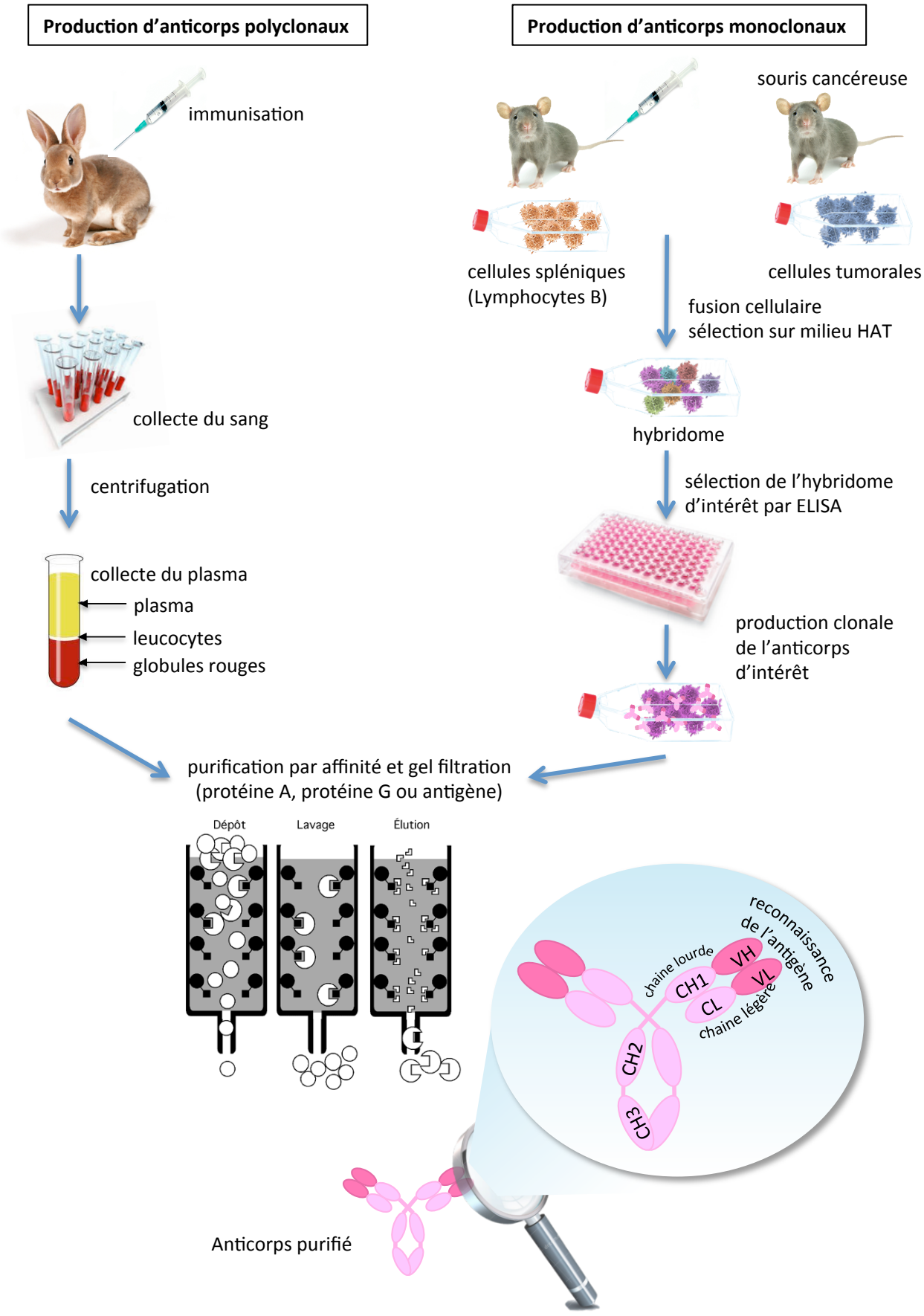
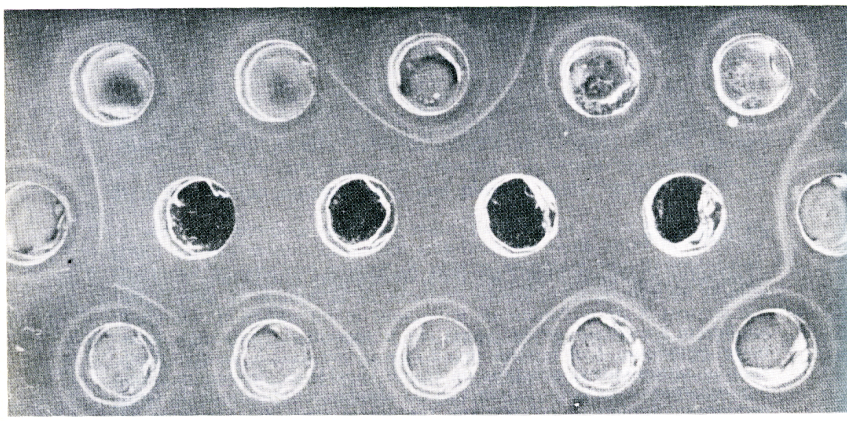


Figure 2.8. Méthodes de production et de purification des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Dans les deux cas, l'obtention d'anticorps passe par l'immunisation d'animaux avec l'antigène d'intérêt et par une phase de purification sur colonne d'affinité.

particules virales ou des protéines virales purifiées, aboutissant à la production d'IgG dirigés contre l'antigène d'intérêt (figure 2.8). Les principales voies d'injection de l'antigène à l'animal sont sous-cutanées, intradermiques, ou intramusculaires. Pour augmenter le temps d'exposition et la réponse immunitaire, l'antigène est généralement combiné à une émulsion appelée adjuvant lors de l'injection à l'animal. La réaction immunitaire peut être amplifiée par des injections de rappels régulières, avec ou sans adjuvant, afin de maintenir l'activation des lymphocytes B et ainsi augmenter la quantité d'anticorps produits. Le sang de l'animal est ensuite collecté et le plasma isolé. Les anticorps contenus dans le plasma sont ensuite purifiés sur colonne d'affinité pour laquelle les billes portent soit l'antigène d'intérêt, soit la protéine A ou la protéine G, puis par gel filtration. Ces sera sont épuisables et des différences de qualité peuvent exister d'un lot à l'autre, en raison des différences de réponse antigénique entre les animaux ainsi que des différences possibles dans les préparations d'antigènes injectés à ces animaux. La spécificité et le titre des anti-sera peuvent même varier entre les différentes saignées à partir du même animal (Van Regenmortel, 1982).

Contrairement aux anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul épitope de l'antigène. Ils sont produits par des hybridomes (Kohler et Milstein, 1975) qui sont des lignées cellulaires immortelles issues du croisement entre un lymphocyte B produisant les anticorps et une cellule cancéreuse (myélome, figure 2.8). Chaque anticorps monoclonal est produit à partir d'une population clonale dérivée d'une lignée cellulaire d'hybridome unique. Par conséquent, chaque lot d'anticorps monoclonal est constitué d'anticorps homogènes qui reconnaissent en principe l'épitope avec la même spécificité et affinité que le lot précédent. Les anticorps contenus dans le surnageant des cultures cellulaires sont purifiés sur colonne d'affinité contenant des billes sur lesquelles sont fixés soit l'antigène d'intérêt, soit la protéine A ou la protéine G, puis par gel-filtration. La production d'anticorps monoclonaux nécessite des équipements et des compétences très spécifiques mais n'implique pas l'immunisation d'animaux à répétition.

La qualité des anti-sera est importante pour le développement de réactifs de diagnostic et notamment dans la procédure ELISA (Clark, 1981). Les anticorps doivent pouvoir détecter spécifiquement l'antigène d'intérêt avec un bruit de fond réduit. Il existe actuellement des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ArMV ou le GFLV, des anticorps monoclonaux capables de détecter le GFLV et l'ArMV mais aussi des anticorps monoclonaux anti-ArMV présentant



Vuittenez © dans P. Galet, 1977

Figure 2.9. Test sérologique d'Ouchterlony. Un anti-sérum dirigé contre le virus du court-noué a été déposé dans les puits centraux et des extraits concentrés de broyats de vigne ont été déposés dans les puits de bordure. Les arcs blancs formés autour des puits traduisent la présence du pathogène ciblé.

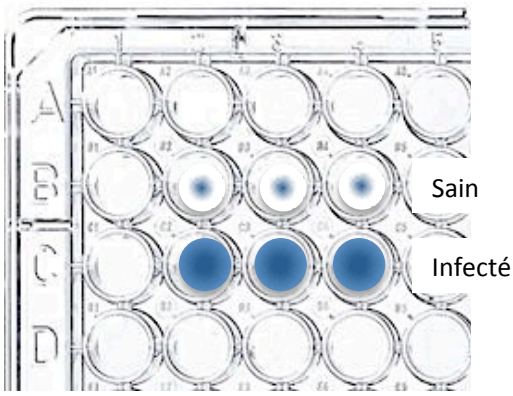


Figure 2.10. Test d'agglutination avec billes de latex. Ce test est basé sur la formation et la sédimentation de complexes anticorps-antigène. Après mise en contact des échantillons et des billes de latex portant les anticorps, une agglutination floconneuse apparaît après deux heures sur la totalité du fond de la cupule pour les échantillons infectés, alors que pour les échantillons sains se forme un point de faible diamètre dans le fond du puits.

une cross-réactivité contre le GFLV (Frison et Stace-Smith, 1992) et inversement (Nölke *et al.,* 2009). Les anticorps sont utilisés pour différentes méthodes de diagnostic, comme dans la procédure ISEM où l'utilisation d'anticorps permet de capturer la particule virale dans un extrait végétal et/ou de mettre en exergue la présence de protéine cible (chapitre 2 II.B). Ils sont également utilisés pour la méthode d'IC-RT-PCR en diagnostic moléculaire (chapitre 2 III.C) où les anticorps permettent la capture des particules virales dans les plaques de type ELISA. Les anticorps sont également utilisés en western blot ou en dot blot, et permettent de révéler la présence de différentes protéines issues du pathogène d'intérêt. Dans le cas du GFLV, il existe des anticorps dirigés contre différentes protéines virales, comme la VPg, la protéase, la MP ou la CP mais les anticorps utilisés en diagnostique ciblent majoritairement la protéine de capside. Des tests sérologiques peuvent également être menés pour évaluer la virulosité des nématodes présents dans le sol par ISEM (Roberts and Brown, 1980) ou par ELISA (Esmenjaud *et al.,* 1993).

2. Immunodiffusion et précipitation en milieu gélifié

La technique d'immunodiffusion radiale (ou test de Mancini) consiste à incorporer un anticorps dans un gel d'agarose, généralement déposé sur un support comme une lame de microscopie. L'antigène est ensuite déposé dans un puits percé dans ce gel. En cas de reconnaissance anticorps-antigène il se formera un anneau de précipitation proportionnel à la concentration en antigène. Pour la technique d'immunodiffusion double (ou test d'Ouchterlony, figure 2.9), les solutions d'antigènes et d'anticorps sont déposées dans des puits distincts, percés à distance égale les uns des autres dans un gel d'agarose fixé sur un support. Les anticorps et les antigènes diffusent dans le gel, et la formation d'arc de précipitation correspond à la formation d'un complexe anticorps-antigène. Ce réseau repose sur le caractère bivalent des anticorps et permet la révélation de la présence de l'antigène. Cette technique a été utilisée pour révéler la présence du GFLV dans des vignes infectées (Vuittenez *et al.,* 1964 ; Galet, 1977) en déposant des extraits de vigne dans les puits. Le titre viral étant généralement faible pour les échantillons vigne, le diagnostic par ce type de test nécessite une étape d'ultracentrifugation des échantillons. La sensibilité de ce test étant relativement faible, estimée 6000 fois moins sensible que l'ELISA pour la détection du GFLV (Shanmuganathan et Fletcher, 1982) elle n'est plus utilisée en diagnostic aujourd'hui.

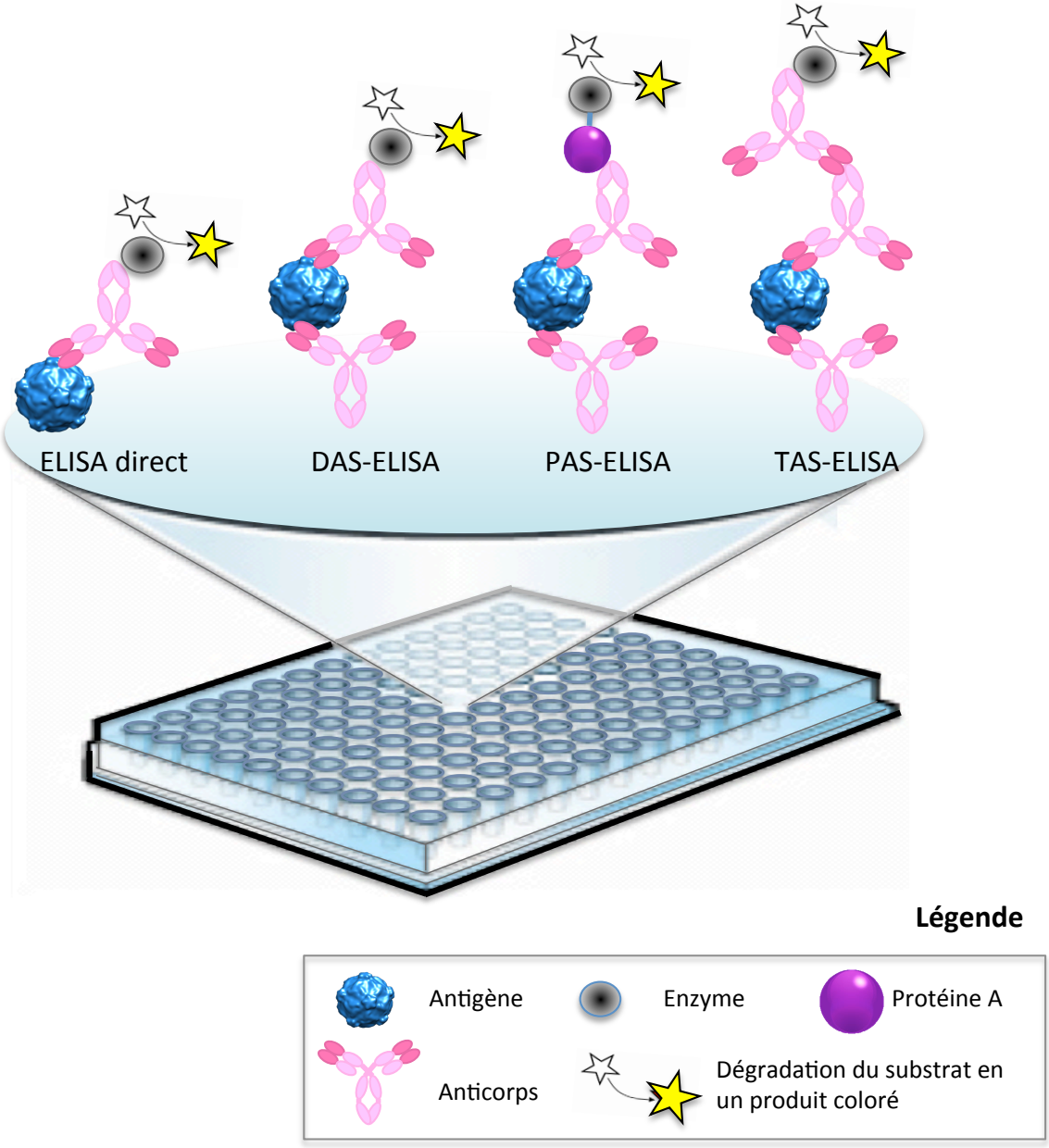


Figure 2.11. Méthodes de diagnostic ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et ses variantes, comprenant l'ELISA direct, le Double Sandwich (DAS-ELISA) le Protein A Sandwich ELISA (PAS-ELISA) et le Triple Antibody Sandwich ELISA (TAS-ELISA). Ces méthodes sérologiques reposent sur la reconnaissance de l'antigène par des anticorps, le plus souvent couplés à une enzyme, qui permet de révéler la présence de l'antigène par la dégradation du substrat en un produit coloré.

3. Test d'agglutination

Les tests d'agglutination sont basés sur la formation et la sédimentation de complexe anticorps-antigène. Lors de ces tests, les antigènes et les anticorps sont déposés dans des cupules à fonds ronds (figure 2.10). Dans le cas du GFLV et de l'ArMV, Bercks et Querfurth (1969 et 1971) se sont basés sur le test de floculation de particules de latex sensibilisé à partir de feuilles de vignes ou de *C. quinoa* infectées par le GFLV et l'ArMV. Les extraits sont clarifiés et chauffés 5 minutes à 55°C. Après mise en contact des échantillons ainsi préparés et des billes de latex portant les anticorps, une agglutination floconneuse apparaît après deux heures sur la totalité du fond de la cupule pour les jus infectés, alors que pour les échantillons sains, le latex sédimente plus lentement, et fini par former un point de faible diamètre dans le fond de la cupule. Cette technique n'est plus utilisée aujourd'hui pour le diagnostic de la maladie du court-noué et a été remplacée par l'ELISA.

4. Le test de diagnostic ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

L'ELISA direct a pour la première fois été décrit en 1971 par Engvall et Perlmann pour la détection de la sérum-albumine humaine (*Human Serum Albumine* ; HSA) par des anticorps anti-HSA couplés à la phosphatase alcaline. Ce test conduit à la détection d'un antigène directement adsorbé sur la plaque ELISA par un anticorps couplé à une enzyme, communément la péroxidase de raifort (*Horseradish Peroxidase* ; HRP) ou la Phosphatase Alcaline (PAL) qui permettent la dégradation du substrat en un produit coloré révélant la présence de l'antigène recherché. L'évolution de ce test a conduit à différentes variantes parmi lesquelles l'ELISA le plus communément utilisé pour le diagnostic viral, le DAS-ELISA (*Double Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, figure 2.11) décrit par Clark et Adams en 1977. Pour ce test, des anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt s'adsorbent dans les puits d'une plaque en polystyrène pour permettre la capture des particules virales. Après lavage, l'échantillon à tester est déposé dans le puits. La détection de la présence de l'antigène est réalisée grâce à des anticorps de détection couplés à une enzyme, ciblant eux aussi l'antigène d'intérêt. La révélation du test est possible suite à la dégradation colorimétrique du substrat par l'enzyme associée à l'anticorps de détection. Le *Triple Antibody Sandwich* ELISA (TAS-ELISA ; figure 2.11) ou ELISA indirect ressemble au DAS-ELISA mais comporte une étape supplémentaire, qui consiste en l'utilisation d'un anticorps, appelé anticorps secondaire, provenant de l'immunisation d'une autre espèce animale que

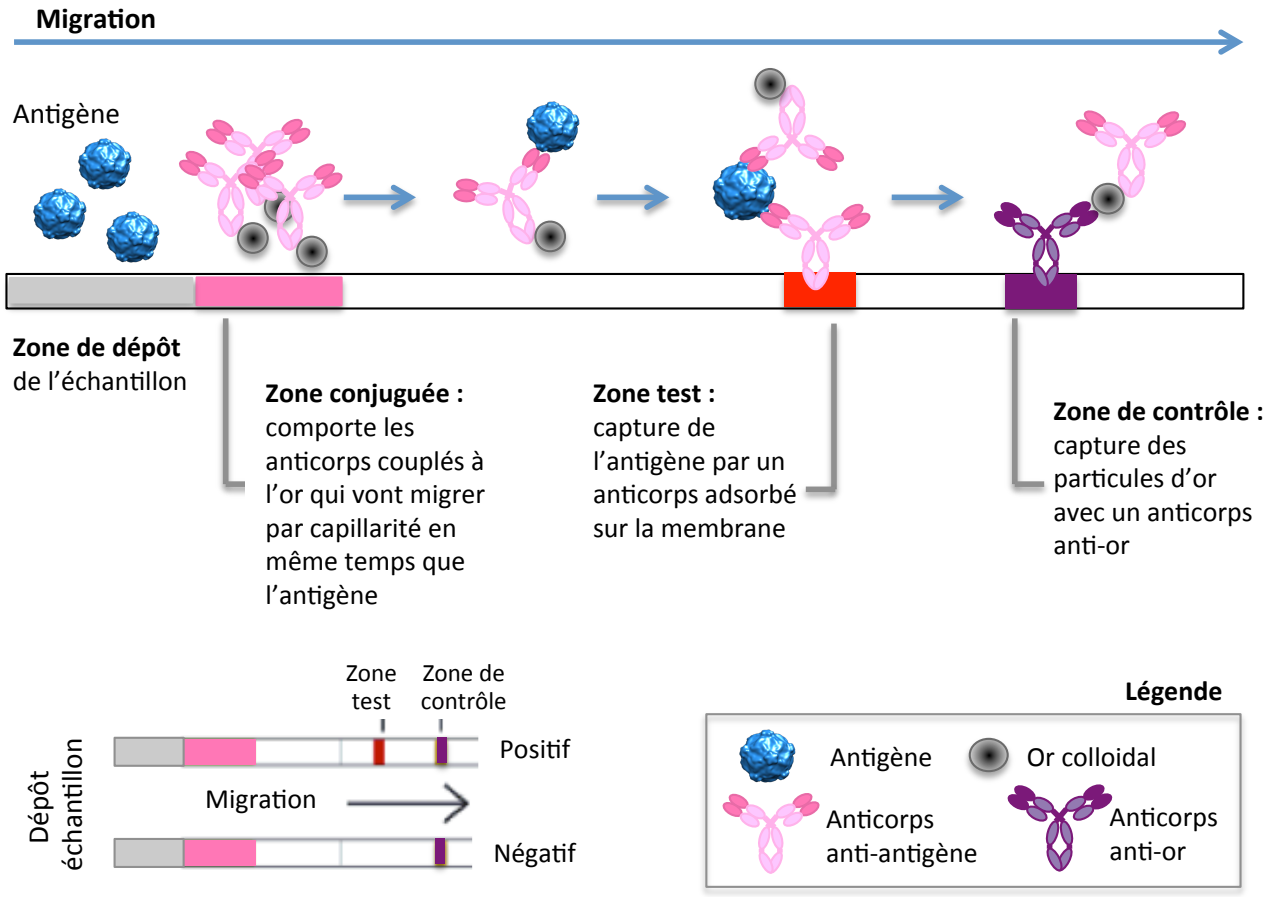


Figure 2.12. Le test immunochromatographique est basé sur la migration de particules le long d'une membrane. Les particules virales seront retenues au niveau d'une zone test et révélées par des anticorps couplés le plus souvent à de l'or colloïdal. Une zone témoin permettra la capture de ces anticorps couplés, attestant de la migration effective de l'échantillon.

l'anticorps de détection, et dirigé contre lui. Si les anticorps de détection sont issus d'une souris alors les anticorps secondaires utilisés seront des anticorps anti-anticorps de souris provenant d'une chèvre par exemple. Après la fixation des anticorps de détection sur l'antigène, les anticorps secondaires couplés à une enzyme reconnaitront l'anticorps de détection, et l'enzyme couplée pourra dégrader le substrat, révélant la présence de l'antigène. Une autre variante de l'ELISA est le Protein A Sandwich ELISA (PAS-ELISA ; figure 2.11). Ce test comporte les même étapes que le TAS-ELISA à la différence que l'anticorps secondaire est remplacé par de la protéine A couplée à une enzyme. La protéine A ayant une affinité élevée pour le fragment Fc des IgG, elle se fixera au niveau de l'anticorps de détection, puis l'enzyme à laquelle elle est couplée permettra la dégradation du substrat et la révélation de la présence de l'antigène.

5. Les kits de détection Immunochromatographie

Le principe du test immunochromatographique repose sur la migration d'un broyat de l'échantillon à tester par capillarité le long d'une membrane (figure 2.12). Les particules virales sont retenues au niveau d'une zone test et révélées par des anticorps couplés à des particules colorées, le plus souvent à du latex ou à de l'or colloïdal. Une zone témoin permettra la capture de ces anticorps couplés par d'autres anticorps, attestant de la migration effective de l'échantillon. Cette méthode de détection est une des rares techniques pouvant être mené directement au vignoble.

6. Détection par Immunofiltration

Récemment, une nouvelle méthode permettant la détection rapide du GFLV a été développée (Rettcher *et al.,* 2015). Des anticorps monoclonaux anti-GFLV sont d'une part immobilisés sur une colonne d'immunofiltration et d'autre part sont couplés à des nanoparticules magnétiques (figure 2.13). Après préparation des colonnes (coating des anticorps, lavage puis blocage des sites libres à la sérum-albumine bovine (BSA)), l'échantillon infecté est déposé au sommet de la colonne et est élué par gravité. Après plusieurs lavages, les anticorps couplés aux billes magnétiques sont à leur tour déposés sur

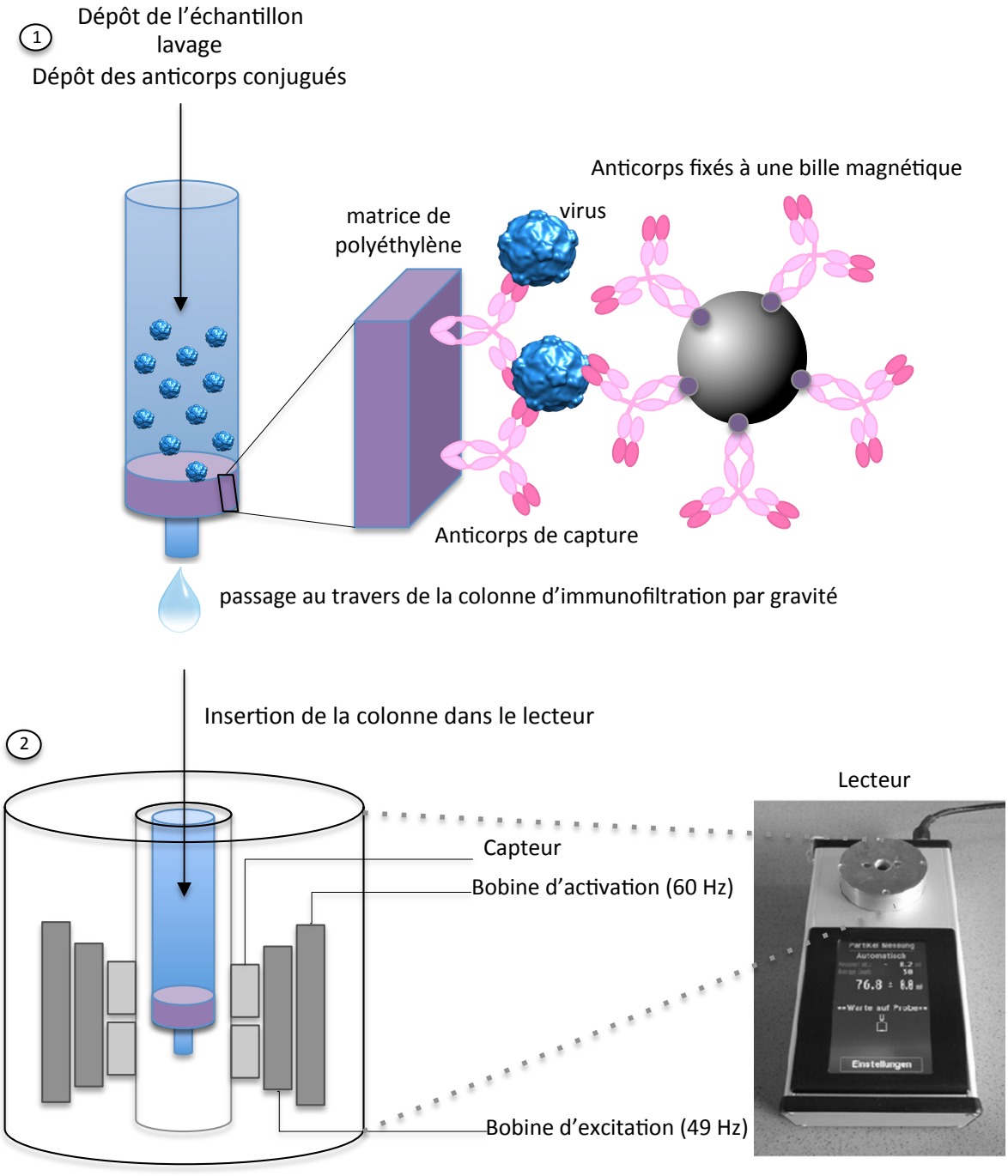


Figure 2.13. Technique de diagnostic par immunofiltration. L'échantillon est déposé dans une colonne de polyéthylène sur laquelle est fixée des anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt. Après lavage, les anticorps liés à une bille magnétique passent à leur tour au travers de la colonne en se fixant sur l'antigène. Après lavage, la colonne est placée dans un lecteur qui permet la quantification des billes magnétique fixées et donc du pathogène d'intérêt. D'après Rettcher *et al.,* 2015.

la colonne. Après lavage, la colonne est insérée dans un lecteur permettant d'estimer la proportion de billes magnétiques et donc de particules virales capturées. Ce test permet la détection en 30 minutes du GFLV dans un extrait de *Chenopodium quinoa*, avec un seuil de détection minimal de 6 ng.

7. Evolution des anticorps

L'ingénierie des anticorps a connu un essor important concernant la conception de différents formats d'anticorps dérivés des IgG conventionnels. Dans ces différents cas, les domaines VL et VH, nécessaires à la reconnaissance de l'antigène sont évidemment préservés. Grâce à la digestion des anticorps par des enzymes comme la pepsine ou la papaïne, la taille de fragments permettant de détecter l'antigène a pu être réduite, donnant respectivement les fragments Fab' (110 kDa) et Fab (50 kDa). Ces fragments ont été utilisés pour le diagnostic du GFLV (Rowhani *et al.,* 1992). De plus, des molécules comportant uniquement les domaines VH et VL appelés ScFv (pour *single-chain variable fagment* ; 25 kDa) stabilisés par un *linker* hydrophile de 3.5 nm ont été générés par génie génétique (Ahmad *et al.,* 2012, figure 2.14). Ces fragments peuvent être produits en bactéries par sécrétion périplasmique, où l'environnement oxydatif permet leur repliement fonctionnel, ou *via* l'utilisation de phagemides (Better *et al.,* 1988 ; Skerra *et al.,* 1988). Les scFv peuvent être modulés pour permettre leur multimérisation (diabodies ou bi-bodies, figure 2.14) ainsi que leur fusion à différentes protéines. Par exemple, ils peuvent être fusionnés à la phosphatase alcaline permettant leur utilisation comme réactif de détection en DAS-ELISA (Kerschbaumer *et al.,* 1997). Les scFv ont également permis la détection en TAS-ELISA du GLRaV-3 (Cogotzi *et al.,* 2008) et du GVB (Saldarelli *et al.,* 2005) à partir d'échantillons de vignes infectées. Ils présentent l'avantage d'une modulation facile et d'une production en bactérie, réduisant les couts de conception pour ce type de réactif de diagnostic. Outre leur utilisation en diagnostic, ils ont également été exploités pour conférer de la résistance au GFLV et à l'ArMV dans des plantes *N. benthamiana* (Nölke *et al.,* 2009).

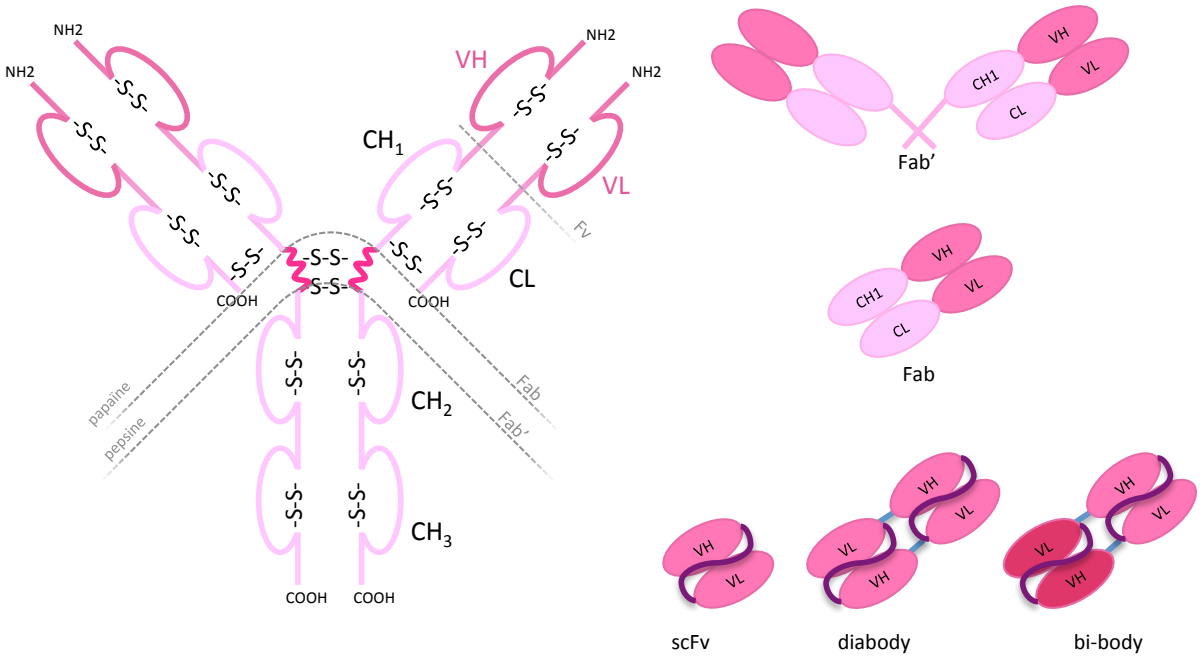


Figure 2.14. Ingénierie de la conception de différents formats d'anticorps permettant la reconnaissance d'antigènes. La digestion d'une IgG conventionnelle par de la pepsine génère le fragment Fab' et celle par la papaïne le fragment Fab. Le fragment Fv peut conduire à l'obtention d'un fragment simple chaine (scFv) dont l'association avec un domaine identique conduit à l'obtention d'un diabody et celle avec un domaine capable de reconnaître un autre antigène à un bi-dody.

V. Comparaison des méthodes de diagnostic actuelles

La spécificité et la sensibilité d'une méthode de diagnostic sont deux paramètres essentiels à la caractérisation correcte d'un pathogène. La spécificité d'une méthode de détection désigne sa capacité à ne pas détecter un échantillon sain, ou non infecté par le pathogène ciblé, tandis que la sensibilité d'un test mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsqu'un échantillon est effectivement infecté. Le spectre de reconnaissance est également un paramètre important pour permettre la détection du plus grand nombre de variants génétique du même pathogène. Pour le diagnostic de la maladie du court-noué par exemple, le test de diagnostic doit donc avoir un spectre suffisamment large pour pouvoir détecter les nombreux variants viraux existants, mais également être suffisamment discriminant pour distinguer les isolats de GFLV et ceux d'ArMV. Plus la méthode de dépistage présente un seuil de détection du pathogène faible, plus il permettra d'établir un diagnostic de façon précoce, pour retirer du circuit de distribution ou du vignoble, le matériel infecté. Les méthodes décrites dans ce chapitre présentent des différences, notamment en termes de rapidité de réalisation et d'obtention des résultats, de sensibilité, de spécificité, de technicité ainsi que des équipements requis et des coûts. Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes sont résumés dans le tableau 2.4.

Les méthodes d'observation des symptômes au vignoble sont peu fiables, compte tenu de la variabilité d'expression des symptômes par les différents cépages, la variabilité de la virulence entre les souches virales et la confusion possible avec des troubles physiologiques. Cette approche sert, à mon sens, comme signal d'alerte pour le viticulteur qui pourra alors s'appuyer sur d'autres méthodes de diagnostics plus fiables. Aussi, l'indexage, bien qu'étant une des méthodes officielles du diagnostic de la vigne semble également obsolète en comparaison avec les méthodes moléculaires et sérologiques, notamment concernant la rapidité d'obtention des résultats et leur sensibilité, mais présente l'avantage d'une recherche de pathogènes sans a priori. Enfin, si les techniques de microscopie sont encore utilisées aujourd'hui (Goldsmith *et al.,* 2009) elles sont essentiellement destinées au domaine de la recherche fondamentale pour décrypter la biologie des virus. Elles nécessitent des équipements lourds et onéreux ainsi que de solides compétences en microscopie, et ne permettent pas d'établir avec certitude l'absence de pathogène.

Méthodes	Nom	Principe	Matériel requis	Recherche du pathogène	Pathogène identifié par analyse	Quantif. relative	Seuil de détection	Sensibilité relative	Spécificité relative	Délai d'obtention du résultat	Temps de MO	Technicité requise	Coût consommable	Coût matériel	Avantages	Inconvénients
Biologique	**Observation symptômes**	observation visuelle des symptômes	-	sans à priori	unique / multiple	non	-	1	1	plusieurs années	2	1	0	0	sans à priori, aucun matériel ni consommable	besoin d'un spécialiste, peu fiable
	Indexage	observation visuelle des symptômes	chambres climatisées, serre de production, vignes indicatrices	sans à priori	unique / multiple	non	-	1	2	plusieurs mois à plusieurs années	2	2	2	2	sans à priori	long, plantes indicatrices à identifier, nécessite maitrise du greffage
	Inoculation mécanique	observation visuelle des symptômes	hôtes herbacées indicateurs, serres	sans à priori	unique / multiple	non	-	2	2	plusieurs jours/ semaines	2	1	1	2	sans à priori, facile	long, plantes indicatrices à identifier
Microscopie	**Optique**	observation visuelle	microscope, loupes binocculaires	sans à priori	unique / multiple	non	-	1	1	une journée	1	2	1	3	sans à priori, observation de structures caractéristiques	besoin d'un spécialiste, infrastructure lourde
	Electronique	observation visuelle	microscope électronique	sans à priori	unique / multiple	non	-	2	2	un à deux jours	2	3	1	3	sans à priori, observation de l'effet de l'infection sur les tissus végétaux	besoin d'un spécialiste, infrastructure lourde
Moléculaire	**Hybridation**	hybridation d'une sonde moléculaire marquée	développeur de film autoradiographique	ciblé	unique	oui	pg	3	3	un à deux jours	1-2	2	2-3	2	plus spécifique que les méthodes PCR, rapide, seuil de détection bas	conception et marquage des sondes
	PCR et variantes	amplification ADN cible	thermocycleur, électrophorèse	ciblé	unique / multiple	oui	pg	3	3	une journée	1-2	2	2	2	Fiable, rapide, seuil de détection bas	coût du matériel et consomable
	rt RT-PCR	détection quantitative par fluorescence d'un fragment d'ADN cible amplifié	thermocycleur, électrophorèse	ciblé	unique / multiple	oui	pg	3	3	une journée	2	3	2	3	Fiable, rapide, quantitatif, seuil de détection bas	technicité requise, coût du matériel et consommable
	Micro/Macroarray	hybridation de séquences homologues marquées avec sondes fixées sur une puce et mesure de fluorescence	lecteur de puces	ciblé	multiple	oui	pg	3	3	plusieurs jours	1-2	3	3	3	Fiable, rapide, multicible	technicité et coût
	NGS	séquençage haut débit	thermocycleur, séquenceur, support informatique puissant	sans à priori	multiple	oui	pg	3	3	plusieurs semaines	3	3	3	3	sans à priori, multicible, accès aux séquences	technicité élevée et coût
Sérologique	**Immunodiffusion**	diffusion d'anticorps en gel	-	ciblé	unique	non	ng	2	3	une journée	1	1	1	0	simple, peu couteux, rapide	production d'un sérum, peu sensible
	Agglutination	agluttination des anticorps	-	ciblé	unique	non	ng	2	3	une journée	1	1	1	0	simple, peu couteux, rapide	obtention d'un sérum, peu sensible
	ELISA	détection du pathogène par un anticorps couplé à une enzyme	spectrophotomètre	ciblé	unique / multiple	oui	ng	3	3	deux jours	2	1	1	2	simple, peu couteux, rapide	production d'un sérum moins sensible que les méthodes moléculaires
	Immuno-chromatographie	migration des anticorps sur membrane	-	ciblé	unique	non	ng	2	3	30 minutes	0	0	1	0	simple, peu couteux, rapide, pouvant être réalisé sur le terrain	production d'un sérum, peu sensible, migration de l'échantillon parfois hétérogène
	Immunofiltration	filtration de l'échantillon infecté sur colonne d'affinité	lecteur magnétique	ciblé	unique	oui	ng	3	3	plusieurs heures	1	2	1	2	simple, quantitatif, rapide, pouvant être réalisé sur le terrain	production d'un sérum, moins sensible que les méthodes moléculaires
								0=faible 3=élevée		0=rapide 3=long		0=facile 3=difficile	0=gratuit 3=cher			

Tableau 2.4. Récapitulatif de différentes méthodes de phytodiagnostic, comparant leur principe et leur caractéristiques. Adapté du tableau GT8 du Réseau Français pour la Santé Végétale (2013). Le temps de MO correspond au temps de mains d'œuvre nécessaire à la réalisation du test de diagnostic

Ces méthodes biologiques et microscopiques de diagnostic sans a priori seront à mon avis avantageusement remplacées par l'approche de NGS. Cette méthode représente un formidable atout pour la certification sanitaire de vignes mères porte-greffes et greffons (matériel de base), et pourrait permettre d'établir avec certitude le statut sanitaire d'un cep de vigne. La distribution de ce type de matériel certifié sans viroses serait clairement un avantage pour endiguer la dispersion des maladies de la vigne. La recherche de virus par NGS dans une plante permet également l'identification de virus émergents qui est très utile pour la veille phytosanitaire. Cependant, les méthodes de NGS, bien qu'exhaustives, ne sont pour l'instant pas utilisables pour l'analyse de très nombreux échantillons, compte tenu de son coût élevé (500 à 1000 euros par échantillon hors prestation) et du temps d'analyse des données relativement long (3 à 4 semaines) (Massart, communication orale 2015). Cette méthode va surement encore évoluer (comme on a déjà pu le voir avec l'avènement du séquençage haut débit) notamment concernant les méthodes d'assemblage des contigs ou encore l'arrivée du séquençage de troisième génération, ce qui conduira à une utilisation de cette technique en routine dans plus en plus de laboratoires. Un autre avantage incontestable du NGS est la multiplicité des pathogènes pouvant être identifiés à partir d'un échantillon unique. Cette multiplicité est également un avantage des techniques comme la PCR-multiplex, le micro/macroarray et le LDA qui permettent de détecter simultanément de nombreux pathogènes et contribuent à réduire le nombre d'analyses à réaliser. Contrairement au NGS, la multiplicité des identifications par ces trois techniques est possible grâce à la conception d'amorces et de sondes, basées sur des séquences virales disponibles, qui ne permettent pas la recherche de virus émergents. Ces méthodes offrent cependant un large spectre de détection tout en permettant l'identification spécifique et distincte de pathogènes. Les puces de micro/macroarray ainsi que les plaques de LDA peuvent être réalisée à façon en choisissant les amorces et la distribution des échantillons sur la plaque ou la puce à réaliser. L'inconvénient de ces techniques reste le prix (de 200 à 300 euros la puce et de 300 euros la plaque) ainsi que les équipements à acquérir pour mettre en œuvre ces techniques en routine.

Parmi toutes les méthodes décrites dans ce chapitre, les techniques ELISA et PCR sont les plus répandues dans les laboratoires accrédités pour le diagnostic et la certification sanitaire des plants de vignes. Elles sont notamment utilisées par des laboratoires de certification,

comme celui de l'IFV, qui sont habilités à répondre aux pépiniéristes et viticulteurs sur l'état sanitaire de leur vigne.

Les méthodes moléculaires de type PCR sont actuellement en pleine expansion et sont adoptées par de plus en plus de laboratoires de diagnostic. Leur sensibilité est leur atout majeur mais leur développement et leur prise en main par les utilisateurs ne sont pas toujours évidents. Le choix des amorces et de sondes robustes est parfois difficile, compte tenu de la diversité génétique des virus infectant la vigne, et la recherche de séquences nucléotidiques hautement conservées entre les différentes souches d'un même virus peut s'avérer délicate. Certains variants génétiques des virus de la vigne peuvent ne pas être détectés par les techniques PCR avec les amorces utilisées en routine. Le développement de ce type de test demande un investissement important en temps et un personnel compétent, surtout dans le but d'une utilisation en routine. De manière générale, la sensibilité des tests PCR est son atout majeur mais est aussi son point faible car les risques de faux positifs sont plus élevés que pour les méthodes sérologiques (Wiedbrauk et Farkas, 1995 ; Boonham *et al*., 2014) et peuvent être dus à des contaminations entres les différents échantillons et témoins. La méthode de nested-PCR permet de réduire ces deux types de risques car elle améliore la spécificité du test en utilisant deux couples d'amorces distincts. En effet, si la première amplification peut mener à plusieurs produits PCR, il est moins probable que l'un des produits de PCR indésirable contienne les séquences cibles de la deuxième paire d'amorce.

Les méthodes PCR requièrent donc un personnel hautement qualifié, et nécessitent de séparer physiquement le lieu de production des matrices, le lieu d'élaboration du milieu réactif et le lieu de la réaction de PCR pour limiter les risques de contaminations. La préparation des échantillons est également une étape critique pour le diagnostic car la vigne contient des polysaccharides et des polyphénols qui peuvent inhiber les réactions enzymatiques (Nassuth *et al*., 2000). Le coût des réactifs et des appareils étant relativement élevé, cette technique très attrayante pour sa sensibilité tend à être optimisée pour en diminuer les frais (Nassuth *et al.,* 2000) ce qui favorisera surement son utilisation en routine.

Les méthodes sérologiques, et particulièrement l'ELISA, sont les méthodes de diagnostic de laboratoire les plus anciennement menés dans les laboratoires de contrôle sanitaire. Ces tests ne sont évidemment possibles que pour les isolats viraux pour lesquels des anticorps ont été développés. Ils ne sont pas utilisables pour la détection des viroïdes infectant la

vigne car ceux-ci ne produisent pas de protéines, contre laquelle les anticorps sont majoritairement dirigés. Ceci peut poser des problèmes car les symptômes liés à ces viroïdes peuvent être amplifiés en cas d'infection par un autre virus. C'est le cas du *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) qui induit des lésions chlorotiques jaunes et des bandes jaunes aux niveaux des veines foliaires des feuilles de vigne et dont la sévérité des symptômes est accrue en présence du GFLV (Szychowski *et al*., 1995). La multiplicité de recherche de pathogènes est également limitée dans le cas de tests sérologiques, bien qu'il existe par exemple des réactifs composés d'un mélange d'anticorps qui permettent de détecter indifféremment les deux principaux virus responsables de la maladie du court-noué (ArMV et GFLV) ou les deux principaux virus de la maladie de l'enroulement (GLRaV-1 et GLRaV-3). Les ELISA sont des tests robustes, très simples d'utilisation et à moindre coût, ce qui explique probablement la persistance de leur utilisation en diagnostic. Les tests d'immunochromatographie et d'immunofiltration semblent être les seuls à pouvoir être réalisés directement au vignoble. L'immunochromatographie présente quelques avantages par rapport à l'ELISA, en particulier la rapidité d'exécution (temps d'obtention du résultat après dépôt de l'échantillon : 30 min maximum), une technicité réduite (manipulation unique : dépôt de l'échantillon) un faible coût et ne nécessite aucun équipement de laboratoire. Ce test présente l'avantage d'être utilisable au vignoble sans intervention d'un professionnel qualifié. Cependant, la présence de polyphénols dans un échantillon vigne peut gêner la migration de l'échantillon le long de la membrane et peut conduire à une absence de reproductibilité de résultats. De plus, le titre viral pouvant être faible pour les échantillons vigne, le diagnostic par ce type de test nécessite souvent une étape de concentration du virus car le couplage des anticorps à l'or colloïdal ou au latex ne confère pas de possibilité d'amplification du signal comme c'est le cas en ELISA grâce aux anticorps couplés à une enzyme. Les tests immunochromatographiques sont d'une sensibilité inférieure à l'ELISA et aux méthodes de diagnostic moléculaires.

La nouvelle méthode de détection des virus du court-noué par immunofiltration n'est pas plus rapide qu'un test en bandelette mais permet la quantification de virus dans un extrait de plante infectée. Il serait intéressant d'évaluer ce test sur des échantillons de terrain (les tests ayant été réalisés pour le moment sur *C. quinoa*), sachant que ce test est présenté comme pouvant être facilement utilisable au vignoble par les viticulteurs car le lecteur est portatif et peut fonctionner sur batterie. Il me semble néanmoins difficile de passer par les

étapes de chargement et de lavage de la colonne sans matériel de laboratoire. De plus, comparé à un test en bandelette ou à un DAS-ELISA, le viticulteur en question devra non seulement payer pour le kit de détection, mais aussi pour le lecteur, ce qui sera à mon avis un frein pour son utilisation. Par contre, l'utilisation de cette méthode en laboratoire d'analyse et l'acquisition de ce type de lecteur pourraient être intéressants pour le suivi et la quantification d'infection virale au vignoble.

Le diagnostic des échantillons vigne est le plus souvent réalisé par un laboratoire agréé qui propose le diagnostic sous forme de prestation de service. Les clients sont majoritairement des viticulteurs et des pépiniéristes. Tous les 5 ans les pépiniéristes doivent tester l'ensemble de leurs collections de pieds de vigne mère. À l'IFV, jusqu'à 15000 échantillons peuvent ainsi être testés durant cette période. Le coût de revient du test est donc également un élément décisif dans son utilisation en routine et un élément clef pour le client. Le prix d'un diagnostic des virus de vigne tels que le GFLV ou le GLRaV par les techniques de PCR, varie entre 25 et 40 euros par échantillon (sources Bioreba AG et IFV). Celui réalisé par kit d'immunochromatographie coûte entre 5 et 10 euros et celui d'un ELISA entre 15 et 25 euros (sources Bioreba AG et IFV). Le prix d'un diagnostic en prestation par puce de microarray ou de macroarray est estimé entre 300 et 500 euros et par NGS de 1000 à 2000 euros par échantillon. La durée d'obtention du résultat varie de quelques minutes (striptest, immunofiltration) à une journée (PCR, hybridation moléculaire) à deux jours (DAS-ELISA) ou plusieurs jours (microarray et macroarray) voire à plusieurs semaines (NGS) et même plusieurs années (indexage). Les méthodes les moins chères et les moins chronophages sont souvent choisies préférentiellement par les utilisateurs, prestataires et clients. Le DAS-ELISA est un test robuste qui fait partie des tests les plus simples, les moins chers et les plus rapides, ce qui explique sa popularité.

Aujourd'hui, il existe donc plusieurs méthodes pour l'identification des virus infectant la vigne. Cependant, la méthode choisie doit dépendre de la question posée et du pathogène recherché. Si la sensibilité du test est recherchée, dans le but de certification de vignes mères par exemple, les techniques PCR ou NGS sont très utiles. Si le but est de rechercher le maximum de virus connus par échantillon, alors les techniques de détection multiples peuvent être envisagées. Si la recherche est exploratoire et veut être plus exhaustive et sans a priori, alors l'indexage et le NGS sont à privilégier. Si le but est de déterminer si une plante

est infectée ou non, pour des questions sanitaires, l'utilisation d'une technique de pointe coûteuse n'est pas vraiment nécessaire et le DAS-ELISA est largement satisfaisant. En dehors des campagnes de détection obligatoires, les vignes sont généralement testées après l'apparition de symptômes, une fois l'infection bien installée, et l'ELISA peut alors être suffisant pour poser un diagnostic précis.

Le développement de toutes ces techniques montre surtout que le domaine du phytodiagnostic est très dynamique et en constante évolution. Bien que de nombreuses techniques soient en cours de développement ou déjà plus largement utilisées en laboratoire pour le diagnostic de la maladie du court-noué, les deux seules méthodes reconnues officiellement en France pour l'établissement d'un diagnostic de cette maladie sont l'indexage et le DAS-ELISA. Par sa simplicité, sa rapidité et sa capacité à traiter de nombreux échantillons à faible coût, l'ELISA s'est imposé comme le test de routine en laboratoire et ne semble pas tout à fait prêt d'être totalement remplacé, même si de plus en plus de laboratoires utilisent les techniques de PCR ou même de NGS pour le diagnostic viral, à la place ou en complément de cette méthode sérologique. Cependant, le développement et la production d'anticorps coûtent cher et nécessitent des équipements et des compétences très spécifiques. La production d'anticorps polyclonaux à partir du sang de mammifères est lourde, les sérums épuisables et de qualité variable d'un animal à l'autre. L'élevage des animaux, leur immunisation et leur manipulation pour la production d'anticorps sont très réglementés et nécessitent des habilitations à l'expérimentation animale. De même, l'obtention d'anticorps monoclonaux possédant une affinité et une spécificité satisfaisante peut s'avérer difficile et leur maintien en culture cellulaire ainsi que leur purification nécessitent des infrastructures relativement coûteuses. Ces anticorps purifiés à partir de sérum d'animaux immunisés pourraient être avantageusement substituée en ELISA par des peptides recombinants nommés Nanobody® (Nb).

Introduction

Chapitre III. Les Nanobodies

Chapitre III. Les Nanobodies

Le système immunitaire adaptatif des vertébrés supérieurs est basé sur un mécanisme de défense spécifique permettant la reconnaissance du non-soi et donc des agresseurs potentiels. La réponse humorale, qui fait partie de cette immunité adaptative, agit contre les pathogènes grâce à la capacité des lymphocytes B à produire des milliards d'anticorps différents, dont la sélection permettra la reconnaissance spécifique et la neutralisation du pathogène. Cette spécificité de reconnaissance des anticorps présente de nombreux intérêts médicaux et biotechnologiques et est largement exploitée dans le domaine du diagnostic. Depuis la découverte chez les camélidés, d'anticorps composés uniquement de chaines lourdes existants en plus des anticorps classiques composés de chaines lourdes et légères, de nouvelles perspectives se sont ouvertes.

I. Les anticorps à chaînes lourdes

1. Découverte

Dans les années 1980, lors de travaux pratiques à l'Université de Bruxelles (*Vrije Universiteit Brussel,* VUB), les étudiants en biologie étaient formés à la purification d'anticorps à partir de sang humain d'un volontaire de la classe. Certains étudiants ne voulant pas se soumettre à cette pratique, ni utiliser du sang de souris si celle-ci devait être tuée pour ces travaux pratiques, leur superviseur, le professeur Raymond Hamers, a dû trouver une alternative. Du sang de lama, utilisé dans le cadre d'autres travaux pratiques pour tester la présence de trypanosome en test d'agglutination, était disponible dans un congélateur et fut donc utilisé pour ces travaux pratiques. Après purification sur colonne d'affinité protéine A et analyse sur gel SDS-PAGE, une bande supplémentaire de 90 kDa ne correspondant pas à la taille des anticorps conventionnels fut observée, suggérant la présence d'anticorps composés de chaines lourdes plus petites que les anticorps conventionnels et ne présentant pas de chaines légères. Les résultats obtenus ont été répétés et vérifiés, et ont conduit deux années plus tard à l'établissement d'une nouvelle classe d'anticorps coexistant avec les anticorps conventionnels chez les camélidés, composés uniquement de chaines lourdes (HCAb pour *Heavy-chain-only antibodies* ; Hamers-Catserman *et al.,* 1993).

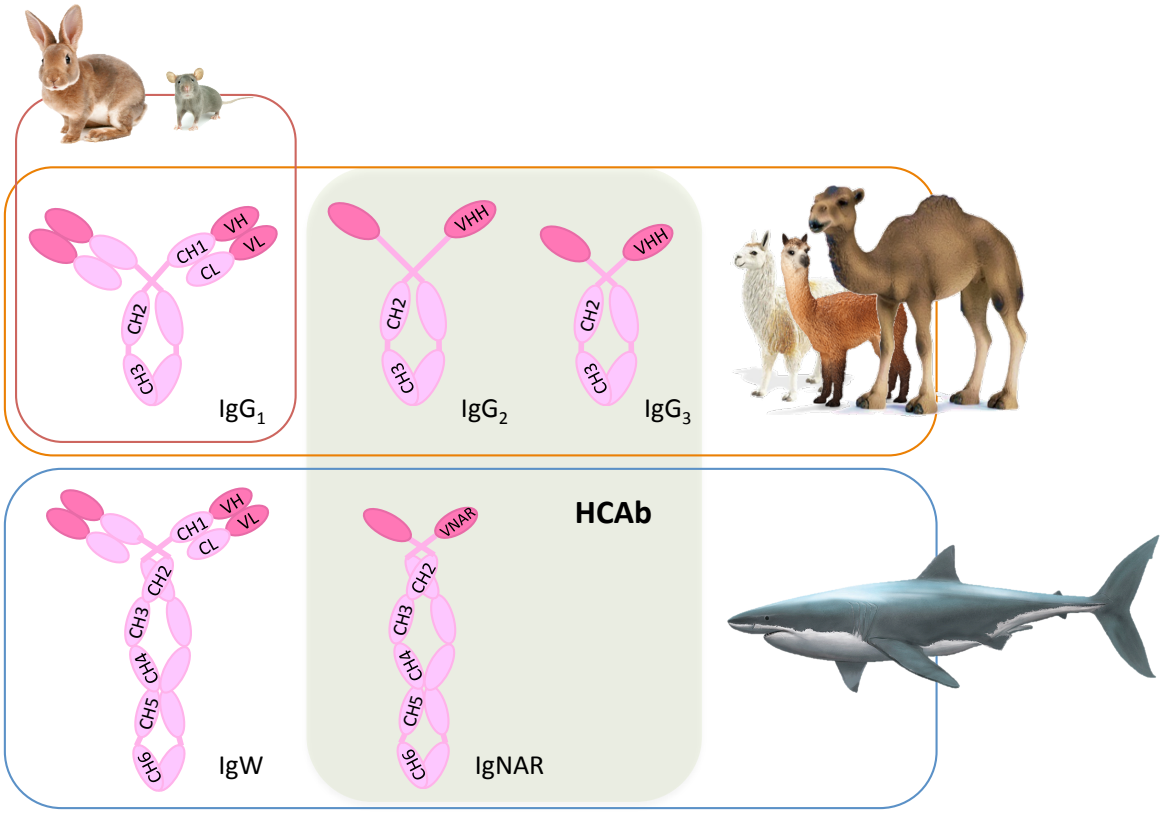


Figure 3.1. Les anticorps des vertébrés supérieurs. En plus des anticorps conventionnels composés de deux chaines lourdes et de deux chaines légères, les camélidés et les poissons cartilagineux possèdent des anticorps uniquement composés de chaines lourdes (HCAb pour *heavy chain only antibodies*) où le site de reconnaissance de l'antigène n'est composé que d'un domaine unique contrairement aux anticorps classiques dont le paratope est formé des domaines VH et VL.

2. Structure

En plus des immunoglobulines conventionnelles (IgG1), il existe donc chez les camélidés des anticorps composés d'homodimères de chaines lourdes (IgG2 et IgG3, figure 3.1). Les domaines CH2 et 3 forment le fragment Fc et sont conservés pour ces trois classes d'immunoglobulines. Pour les IgG2 et 3, le domaine CH1 est absent et le domaine variable formant le paratope est unique et lié directement à la région charnière (hinge), définissant par sa taille la classe de l'IgG (IgG2 pour une région charnière de 15 à 35 acides aminés, IgG3 pour une région charnière de 12 acides aminés). En comparaison des anticorps conventionnels pour lesquels l'association des domaines VL et VH est indispensable à la reconnaissance de l'antigène, un domaine unique appelé VHH forme le paratope des IgG2 et 3. Ces IgG à chaines lourdes représentent en moyenne 50 à 80% des IgG totales chez les camélidés tels que *Camelus dromedarius* et *Camelus bactrianus* et de 10 à 25 % chez les camélidés du Nouveau Monde, tels que *Lama glama, Lama guanicoe, Vicugna pacos, Vicugn avicugna* (Muyldermans, 2013). On retrouve également ce type d'immunoglobulines composés de chaines lourdes chez les poissons cartilagineux comme les requins (*Orectolobus maculatus, Mustelus canis, Chiloscyllium plagiosum*…) appelés IgNAR (pour *Immunoglobulin New Antigen Receptor*) qui sont présents à une concentration estimée à 0.1-1.0 mg/ml dans le sérum de ces poissons cartilagineux (Barelle et Porter, 2015). Comparés aux anticorps classiques de ces poissons cartilagineux appelés IgW, ceux-ci sont formés d'homodimères portant un domaine variable unique formant le paratope, appelé V-NAR (*New Antigen Recoptor Variable domain*) et de cinq domaines constants (figure 3.1). Des IgG composés uniquement de chaines lourdes ont également déjà été retrouvées dans du sang d'humains malades (Alexander *et al.,* 1982 ; Cogne et *al.,* 1989) où l'absence du domaine VL entraine la perte de reconnaissance des antigènes par ces anticorps.

Le rôle des HCAb dans l'immunité n'est pas encore totalement compris. Leur conformation compacte pourrait conférer une meilleure reconnaissance de certains pathogènes et augmenter le répertoire immunitaire des camélidés (Muyldermans, 2013) et leur présence dans le colostrum des lamas femelles indiquent leur importance dans l'immunisation passive des nouveaux nés (Daley-Bauer *et al.,* 2010). La coexistence d'Ig conventionnelles et de HCAb chez des vertébrés phylogénétiquement éloignés, indiquerait l'avantage conformationnel procuré par ces anticorps pour la reconnaissance d'épitopes concaves difficilement accessibles aux anticorps conventionnels, nécessitant les domaines VH et VL pour former le paratope (Flajnik *et al.,* 2011; Smolarek *et al.,* 2012). Cette coexistence

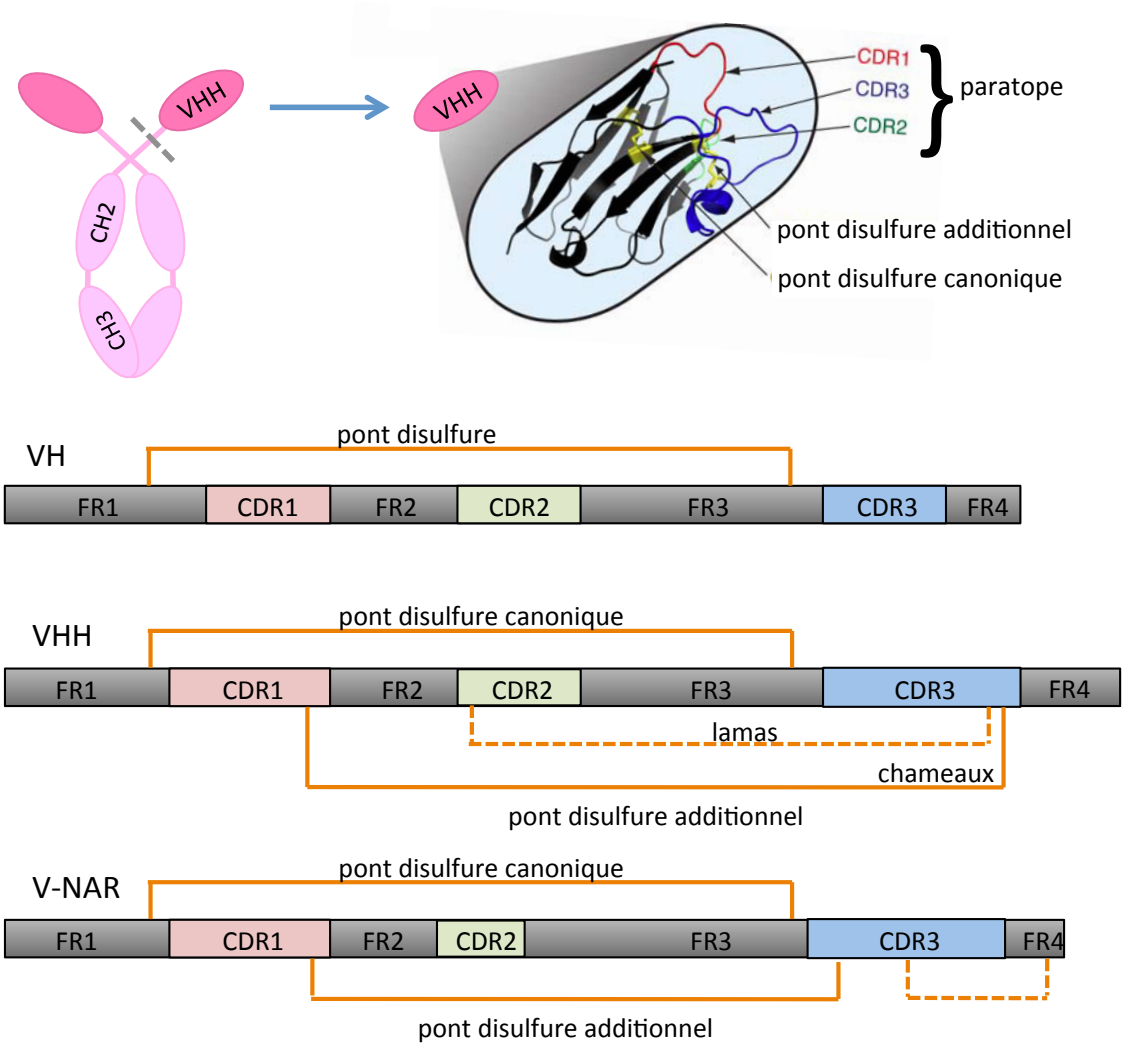


Figure 3.2. Description structurale de Nanobody montrant son organisation en feuillet beta anti-parallèles. Les trois CDR (*complementary determining regions*, CDR1 à 3) sont les domaines impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Ils sont encadrés par quatre régions stabilisatrices appelées *framework* (FR 1 à 4). Comparés au VH des anticorps conventionnels, les domaines CDR1 et 3 des VHH et des V-NAR sont plus longs, permettant la reconnaissance de l'épitope antigénique avec une affinité comparable à celle des anticorps conventionnels. Les Nanobodies possèdent également un pont disulfure additionnel entre le CDR1 et 3 pour les chameaux et les poissons cartilagineux ou de façon moins fréquente entre le CDR2 et 3 chez les lamas et entre le CDR3 et le FR4 chez les poissons cartilagineux (d'après Wesolowski *et al.,* 2009 et Flajnik *et al.,* 2011).

existerait depuis longtemps car il semblerait que les IgNAR soient apparues il y a 220 à 420 millions d'années (Barelle et Porter, 2015). Par contre, les VHH et les V-NAR ne présentent que 25 à 30% d'identité de séquences, et si les domaines VHH des camélidés semblent clairement avoir évolué d'un domaine VH, les V-NAR montrent des caractéristiques communes à la fois aux VH et CH mais surtout aux récepteurs de lymphocytes T, montrant qu'ils ont probablement évolué de ce type de récepteur cellulaire de surface (Feige et Buchner, 2014). Les HCAb possèdent donc l'avantage de ne nécessiter que d'un seul domaine de reconnaissance de l'antigène, qui présente les mêmes diversités, spécificités et affinités que les anticorps conventionnels. Ce domaine pouvant être isolé tout en conservant ses propriétés est appelé VHH ou communément par son nom commercial Nanobody®, en raison de sa petite taille, dix fois plus petite qu'un anticorps classique.

II. Les Nanobodies

1. Structure

Un Nanobody (Nb) est un domaine globulaire d'environ 15kDa généralement composé d'une centaine d'acides aminés organisés en feuillets beta antiparallèles (figure 3.2). Sa forme oblongue mesure environ 2.5 nm de diamètre et 4 nm de long. Un Nb contient trois boucles hypervariables, numérotées d'après leurs positions dans la séquence peptidique, complémentaires de l'épitope antigénique (*Complementarity Determining Regions*, CDR1 à CDR3). Ces régions sont encadrées par quatre régions stabilisatrices (*Framework Regions*, FR1 à FR4), constituant la charpente du Nb. Les trois CDR sont généralement localisés au niveau de boucles situées entre les feuillets β et sont regroupés sur une des faces du Nb, généralement orientés du côté N-terminal. Les CDR1 et 3 des Nb sont plus longs que ceux des VH, permettant la reconnaissance de l'antigène avec une affinité comparable aux anticorps conventionnels. Les six CDR composant le paratope des anticorps classiques (trois CDR des VH et trois des VL) contribuent pratiquement de façon équivalente à la reconnaissance de l'antigène. Chez les VHH, le CDR3 est le domaine principal de reconnaissance et est impliqué de 60% à 80% dans l'interaction à l'antigène. La longueur du CDR3 est généralement supérieure à une vingtaine d'acides aminés alors qu'elle n'excède pas neuf pour le VH de souris et douze pour le VH humain (Dmitriev, Lutsenko et Muyldermans, 2015). La surface du paratope est comparable à celle des anticorps

conventionnels (600 à 800 $Å^2$, Muyldermans, 2013) alors que sa forme est plus petite et plus convexe, permettant la reconnaissance d'épitopes concaves, cryptiques ou enfouis, alors que les anticorps conventionnels reconnaissent préférentiellement des épitopes plats voire convexes (De Genst *et al.,* 2006 ; Muyldermans *et al.,* 2009). Chez les V-NAR, le CDR2 est vestigial et ne contribue quasiment pas à la reconnaissance de l'antigène (Streltsov *et al.,* 2004). Le CDR1 des VHH présente deux régions très favorables ou *hotspots* d'hypermutation somatique supplémentaires par rapport aux VH. Ces points de recombinaison génétique permettent la maturation de l'immunoglobuline produite en ajustant les régions hypervariables reconnaissant l'antigène et modulent l'affinité de l'anticorps pour son épitope (Janeway *et al.,* 2001). La présence de ces *hotspots* supplémentaires conduit à une augmentation de la variabilité en résidus de cette boucle, et contribue au fait que les VHH possèdent un répertoire à la diversité comparable à celle issue de l'association des VH et VL composant le paratope des anticorps conventionnels (Muyldermans *et al.,* 2009). La région FR2 des VHH est également différente dans sa composition en acides aminés. Chez les VH, la région FR2 est une région fortement conservée riche en acides aminés hydrophobes, permettant l'interaction avec le domaine VL pour former le paratope. Chez les VHH, le FR2 contient au contraire des acides aminés hydrophiles, empêchant toute liaison avec un éventuel domaine VL et conférant une solubilité élevée aux Nb (Muyldermans *et al.,* 2013). En plus du pont disulfure canonique intra-domaine entre le FR1 et le FR3 chez les VH et VHH, les VHH présentent également de manière occasionnelle un pont disulfure supplémentaire, qui participe à la stabilisation du CDR3 en le reliant au CDR1 chez les chameaux, et moins fréquemment au CDR2 chez les lamas. Le pont disulfure additionnel reliant le CRD3 au CDR1 a également été décrit chez les V-NAR de requins (Wesolowski *et al.,* 2009 ; Muyldermans , 2013) et serait nécessaire à la stabilité des VHH en conditions extrêmes (habitat aride des camélidés, forte concentration d'urée dans le sang des requins ; Vincke et Muyldemans, 2012).

2. Obtention et production de Nanobodies

Les Nb sont généralement obtenus après 2 à 6 immunisations sur 3 à 6 mois d'un camélidé, pouvant être immunisé simultanément avec une dizaine d'antigènes différents. Après collecte du sang et isolation de lymphocytes B, les ARNm des lymphocytes B sont purifiés et rétro-transcrits en ADNc (figure 3.3). Les gènes codant pour les VHH sont ensuite amplifiés

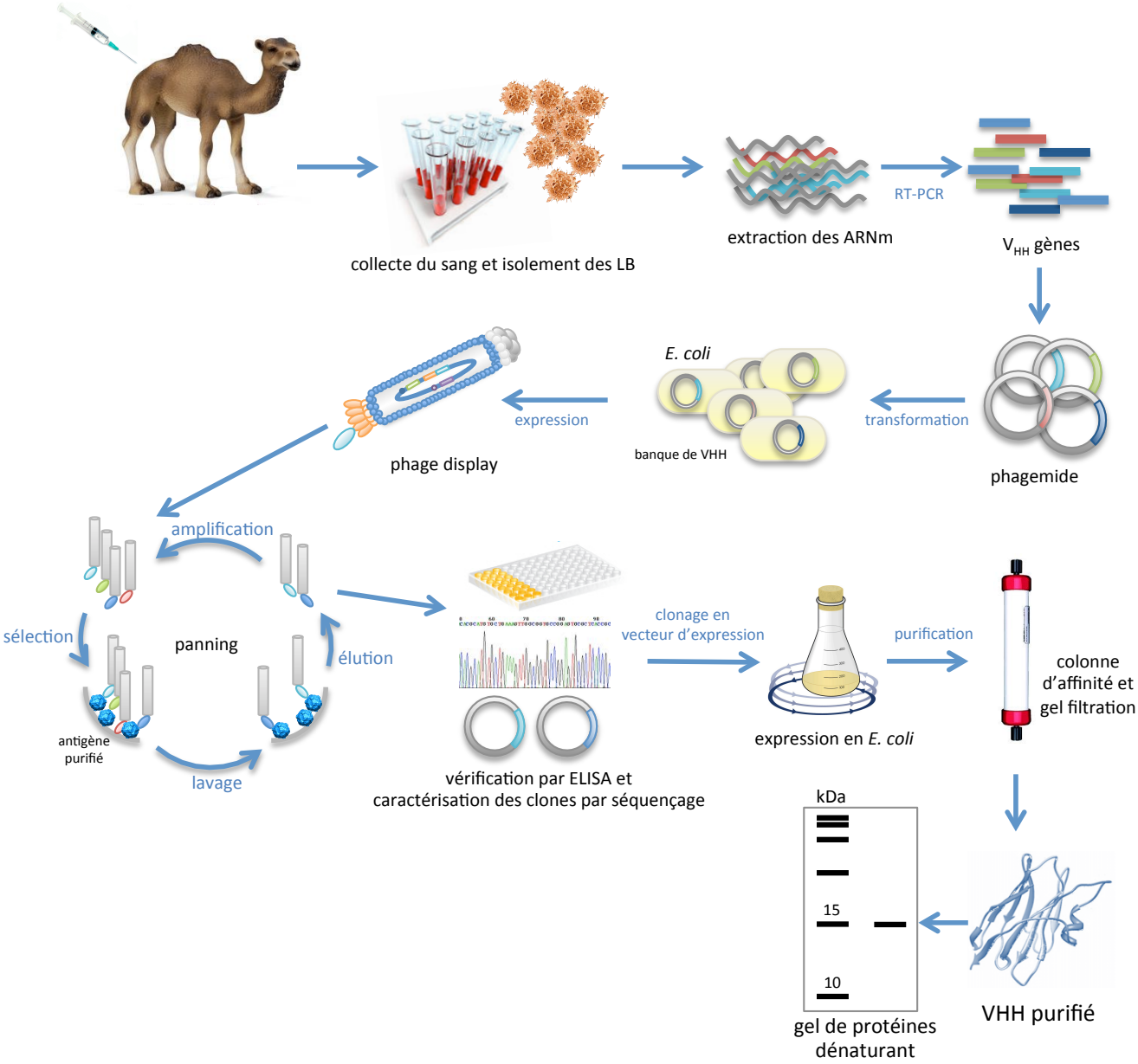


Figure 3.3. Représentation schématique des différentes étapes d'obtention, de caractérisation et de purification de Nanobody (Nb) d'intérêt. Les Nb sont obtenus après immunisation d'un camélidé et isolement de ses lymphocytes B. Après le clonage des séquences d'intérêt dans un vecteur phagemide, les clones reconnaissant l'antigène sont sélectionnés par phage display et amplifiés par plusieurs cycles de biopanning. Après vérifications des clones par ELISA, ceux-ci sont séquencés pour être caractérisés. Les séquences de ces Nb sont ensuite clonées dans des vecteurs d'expression et les Nb produits en bactéries. Les Nb sont généralement purifiés sur colonne d'affinité grâce à une étiquette histidine ajouté en phase, et à une gel filtration.

par nested-PCR, générant des fragments de 360 paires de bases. Ces fragments sont clonés dans des vecteurs phagemides pour constituer un répertoire d'environ 10^8 transformants représentatifs du répertoire de lymphocytes B provenant de 50 ml de sang. Dans le cas où l'immunisation n'est pas possible car toxique ou non immunogène, ou que l'antigène ne peut pas être suffisamment purifié, les VHH peuvent être issus de banque naïve, synthétique ou semi-synthétique composée cette fois de 10^9 clones. Cependant, les Nb issus d'une banque naïve ne sont pas toujours avantageux. C'est notamment le cas de Nb dirigés contre le venin de cobra, où seuls les Nb obtenus après immunisation se sont révélés effectivement neutralisants, alors que ceux issus d'une banque naïve, présentant une affinité 1000 fois inférieure, ne permettaient pas une protection efficace contre ce venin (Richard *et al.,* 2013). Les Nb spécifiques de l'antigène d'intérêt sont généralement sélectionnés et enrichis par phage display et le panning est réalisé sur des antigènes immobilisés par adsorption passive sur plaque de microtitration. Généralement, deux ou trois rounds de panning suffisent pour enrichir les clones intéressants. Leur capacité effective à reconnaitre l'antigène est par la suite testée en ELISA, et les clones positifs sont alors séquencés afin d'accéder à la séquence des Nb d'intérêt. Ces VHH sont alors clonés dans des vecteurs d'expression pour leur production en bactéries *via* un peptide signal, qui entraine leur export vers le périplasme où les conditions oxydatives favorisent le repliement correct des Nb et la formation de ponts disulfures. Après extraction périplasmique, la purification des Nb est simple, car ceux-ci peuvent être clonés en phase avec une étiquette 6His permettant leur purification sur colonne d'affinité HisTrap puis gel filtration. Les rendements de purification des Nb varient, mais peuvent généralement atteindre une dizaine de mg par litre de culture (Muyldermans *et al.,* 2013). La technique de NGS a été utilisée pour estimer la fréquence de gènes codant pour les domaines VH et VL après immunisation de souris et les plus abondants ont été associés pour former des scFv (Reddy *et al.,* 2010 ; Ravn *et al.,* 2010). Cette méthode a montré la présence de VL et VH fréquemment rencontrés qui n'avaient pas été sélectionnés lors des phases de panning et d'ELISA. Cette technique pourrait être appliquée à la sélection de Nb car les séquences de VHH prévalentes correspondent aux lymphocytes B qui ont le plus proliféré suite à l'immunisation, et qui sont donc les plus à même de reconnaître le pathogène (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.,* 2013).

3. Propriétés et avantages

Les Nb sont le plus petit fragment reconnaissant un antigène connu à ce jour. Un de leur avantage indéniable est que leur structure monomérique simplifie considérablement leur clonage à partir des ARNm des lymphocytes B et leur production dans différents organismes (bactéries, levures, plantes..). La constante d'affinité des Nb pour l'antigène est de l'ordre du nanomolaire voire du picomolaire pour ceux issus d'une banque immunisée, et de l'ordre du micromolaire pour ceux issus d'une banque naïve (Muyldermans *et al.,* 2013 ; Siontorou *et al.,* 2013). Leur structure et leur taille leur permettent l'accès et la reconnaissance d'épitopes non reconnus par les anticorps conventionnels, en particulier des épitopes concaves comme des poches ou les sillons des enzymes, pouvant de ce fait inhiber leur activité (De Genst *et al.,* 2006). Leur composition simple chaine facilite leur modification en Nb bi, tri-spécifiques ou encore multimèriques et leur fusion à différentes protéines sans altération de reconnaissance de l'antigène (Muyldermans, 2013). Leur grande stabilité leur confère une résistance à des conditions extrêmes (température, pH, concentration en urée..). Par exemple, des Nb anti-caféine ont été développés pour tester la concentration en caféine dans différentes boissons chaudes par *striptest* et sont capables de détecter la présence de caféine à 90°C (Ladenson *et al.,* 2006) alors que leur point de fusion est généralement situé entre 60 et 80°C (Vanlandschoot *et al.,* 2011). De même, des Nb produits pour lutter contre l'activité uréase d'*Helicobacter pylori* sont capables d'inhiber cette enzyme, même après 30 minutes d'incubation à 90°C ou durant un traitement d'une nuit à l'urée à la concentration de 5 à 10 µg/ml (Ardekani *et al.,* 2013). Les VHH sont généralement actifs après 1 semaine d'incubation à 37°C, plusieurs mois à 4°C, et peuvent être stockés plusieurs mois, voire années, à -20 ou -80°C sans altération de leur capacité à reconnaître l'antigène (Siontorou, 2013). Les V-NAR peuvent aussi être capables de reconnaître un antigène après une heure à plus de 80°C et jusqu'à un mois à 37°C (Marschall et Porter, 2015). Cette stabilité provient certainement de la présence de ponts disulfure, mais aussi de la capacité de retour à la conformation native des Nb après dénaturation (Perez *et al.,* 2001 ; Ewert *et al.,* 2002). Cette stabilité peut même être encore améliorée en introduisant une cystéine en position 54 et 78, pour former un pont disulfure supplémentaire (Hagihara *et al.,* 2007 ; Saerens *et al.,* 2008). Comme la charpente des Nb est relativement conservée, il est même possible dans certains cas de greffer le CDR3 d'un Nb peu stable sur la charpente d'un Nb connu pour sa stabilité, créant un Nb chimérique associant l'avantage de la capacité de reconnaissance de l'un à la stabilité de l'autre (Saerens *et al.,* 2005). Les Nb sont également

très solubles. Ils peuvent généralement être concentrés jusqu'à 10 ou 20 mg/ml sans agrégation (Conrath *et al.,* 2005) grâce à l'hydrophilie de la région stabilisatrice FR2. La substitution d'autres acides aminés dans les différents *framework* peut également favoriser la solubilisation des Nb (Muyldermans, 2001).

III. Applications des Nanobodies

Les anticorps ont toujours suscité un intérêt important dans le domaine du diagnostic et de la thérapeutique. L'obtention de fragments plus petits permettant la reconnaissance d'un antigène a souvent été un objectif pour faciliter leur sélection et leur production. Ainsi, les scFv ont largement été développés dans ces deux domaines, notamment pour cibler des toxines comme la toxine botulique ou pour cibler des virus tels que le VIH ou la grippe (Unkauf *et al.,* 2015). Cependant, les propriétés, la facilité d'obtention et de modification des Nb ainsi que leur production à moindre coût en font un outil généralement plus avantageux et applicable à différents domaines.

1. Thérapeutique

Le domaine médical constitue le premier champ de développement et d'utilisation des Nb. Les Nb présentent l'avantage d'être plus facile et moins cher à produire ; ils reconnaissent des épitopes non accessibles aux anticorps conventionnels avec affinité ; ils pénètrent plus facilement les tissus et sont capables de passer au travers de la barrière hémato-encéphalique contrairement aux anticorps classiques ; ils sont mieux éliminés par le système rénal et sont plus résistants aux conditions parfois extrêmes du corps humain. L'utilisation des V-NAR en thérapeutique n'est que peu développée actuellement et se limite à sept cibles différentes dont le virus Ebola ou le choléra (Marschall et Porter, 2015). L'utilisation des VHH en thérapeutique est largement plus développée. Leur capacité de neutralisation de toxines a été mise à profit dans le développement de Nb neutralisant la toxine de scorpion (Hmila *et al.,* 2010), le venin de vipère (Harrison *et al.,* 2006) ou de cobra (Richard *et al.,* 2013). Leur petite taille et leur hydrophilie permettent aux Nb de passer la barrière hémato-encéphalique, ouvrant la voie à un traitement immunologique des neuropathies. Deux Nb ont d'ailleurs été développés pour cibler la protéine beta-amyloïde composant les plaques amyloïdes impliquées dans les maladies neurodégénératives comme Alzheimer et

pourraient être utilisés dans le diagnostic ou le traitement de cette maladie (Paraschiv *et al.,* 2012). L'activité neutralisante et la faible immunogénicité des Nb ont également été exploitées pour lutter contre des maladies virales (Valandschoot *et al.,* 2011). Il existe des Nb neutralisants contre les virus du SIDA (Guedon *et al.,* 2015), de l'hépatite C (Jittavisutthikul *et al.,* 2015 ; Tarr *et al.,* 2013), de la grippe (Ashour *et al.,* 2014) ou du poliovirus (Thys *et al.,* 2010). Ces Nb peuvent agir à différents niveaux et peuvent par exemple empêcher la décapsidation du virus. Le type d'épitopes concaves ou cryptiques ciblés par les Nb peut également correspondre au site de fixation du virus au récepteur cellulaire, permettant une inhibition de l'entrée du pathogène par compétition (Strauss *et al.,* 2016). Ces épitopes cryptiques sont généralement hautement conservés et ne sont pas facilement modifiables pour échapper à la détection par les Nb. Ceci confère un net avantage par rapport aux anticorps classiques pouvant cibler des épitopes planes ou convexes dont la mutation, suite à la pression de sélection immunitaire peut entrainer la perte de reconnaissance de l'épitope concerné (Wesolowski *et al.,* 2009). Cependant, des variants viraux peuvent parfois quand même contourner cette neutralisation, tout en demeurant aussi stable que le virus parental (Schotte *et al.,* 2015). La combinaison des Nb avec des particules virales auto-assemblées (VLP) est également intéressante dans le domaine thérapeutique. La plasticité des Nb permet leur fusion à des protéines structurales de virus sans empêcher la formation de VLP. Ceci a été démontré avec la protéine core HBcAg du virus de l'hépatite B (Peyret *et al.,* 2015), où la protéine de fusion Nb-HBcAg conduit à la formation de VLP exposant les Nb qui conservent leurs propriétés de reconnaissance de l'antigène. Cette VLP-Nb peut potentiellement encapsider d'autres protéines ou toxines et pourrait être adressée vers des cellules cibles grâce aux Nb. La production de ces VLP-Nb en plantes pourrait ouvrir la voie à leur utilisation en thérapeutique (Marsian et Lomonossoff, 2016). Ceci pourrait être envisagé pour les VLP du GFLV, car il est possible de fusionner des protéines de part et d'autre de la protéine de capside (Belval *et al.,* 2016 en annexe 2).

Les Nb étant facilement modifiables, ils sont eux-mêmes largement développés pour le diagnostic et le traitement de cancers, pour le ciblage de cellules cancéreuses ou en chimiothérapie. Par exemple, des Nb ciblant l'antigène HER2 exprimé à la surface de cellules tumorales ovariennes et du sein, ont été couplés à des billes d'or à des fins de thérapie photothermique par irradiation, prouvant l'efficacité de cette méthode en système cellulaire (Van de Broek *et al.,* 2011). La stabilité des Nb à pH acide et face à la protéolyse pepsique

présents dans le milieu gastro-intestinal a été exploitée pour permettre l'administration orale de médicaments composés de Nb, conférant un avantage dans la prise en charge et le traitement de patients. C'est le cas pour des Nb permettant la lutte contre *Clostridium difficile* (Kandalaft *et al.,* 2015) ou contre des rotavirus (Tokuhara *et al.,* 2013 ; Maffey *et al.,* 2015) tous deux responsables de diarrhées. La société Ablynx (spin-off de la Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) et l'Université Libre de Bruxelles (VUB), impliquée dans la découverte et le développement de Nb) est également en train de développer l'utilisation de Nb contre l'*Human respiratory syncitial virus* responsable d'infection des poumons et de la trachée en aérosolthérapie, l'administration de Nb se faisant par nébulisation, c'est à dire par inhalation de particules liquides très fines (Kroussoroplis et Vanbever, 2013). Ce traitement est actuellement en phase IIa d'essai clinique. Chez Ablynx, deux autres essais cliniques impliquant les Nb sont en cours pour lutter contre deux maladies auto-immunes, le lupus érythémateux et le purpura thrombopénique, respectivement en phase II et III. Actuellement, six traitements à base de Nb ciblant aussi bien l'inflammation, les maladies respiratoires et auto-immunes ou les cancers, sont impliqués dans une phase d'essai clinique approuvée par l'European Medecines Agency et la US FDA et une quarantaine sont en cours de développement (site internet d'Ablynx, 2016), montrant l'intérêt et l'efficacité de leur utilisation en thérapie.

Cependant, un des aspects négatifs des Nb en thérapeutique est que les Nb ne sont pas capables d'activer le système immunitaire. En effet, contrairement aux anticorps conventionnels, une conséquence de l'absence de fragment Fc chez les Nb, est que ceux-ci ne permettent pas le recrutement de cellules effectrices de l'immunité comme celles du complément, incluant les macrophages et les natural killer qui permettent respectivement la phagocytose ou induisent l'apoptose des cellules ciblées (Chames *et al.,* 2009). Toutefois, cette absence peut être compensée par la formation de Nb bi-spécifiques dont l'un reconnaît la cible d'intérêt et l'autre le récepteur CD16-Fc des natural killer, permettant leur activation et la destruction de la cellule cible (Behar *et al.,* 2008).

2. Imagerie

Le développement de Nb permettant la visualisation de composés d'intérêts, a pour la première fois été décrit par Rothbauer *et al.* en 2006 pour marquer différentes cibles cellulaires (beta-actine, le *proliferating cell nuclear antigen*, l'histone H2B et la lamina) pendant le cycle cellulaire de cellules animales. Plus récemment, des Nb fusionnés à la GFP et dirigés contre la tubuline ont permis la résolution par microscopie de l'organisation de microtubules, composés clef du cytosquelette (Mikhaylova *et al.,* 2015). Ces Nb fusionnés à une protéine fluorescente dénommés chromobodies ou fluobodies, peuvent servir de traceur *in vivo* pour étudier la localisation cellulaire de protéines, l'abondance de composés cellulaires ainsi que la dynamique de leurs interactions avec d'autres molécules. La modification aisée des Nb a permis leur fusion à différentes molécules fluorescentes ou leur couplage chimique à de l'or (Leduc *et al.,* 2013) ou des radioéléments (Vaneycken *et al.,* 2011) mais aussi à des peptides d'adressage spécifiques, permettant leur rétention dans des compartiments cellulaires (Serruys *et al.,* 2010). L'utilisation de tels Nb est un atout pour l'imagerie, couvrant des aspects fondamentaux de la biologie cellulaire à jusqu'aux aspects appliqués de l'imagerie médicale. Comme cité précédemment, les Nb présentent l'avantage de pénétrer facilement dans les tissus grâce à leur petite taille, de passer la barrière hémato-encéphalique et leur spécificité combinée à leur élimination rapide par les reins (seuil limite d'exclusion de 60 kDa) donne lieu à des images avec un excellent signal/bruit, permettant une interprétation de qualité quelques heures seulement après l'injection du marqueur. Pour les anticorps conventionnels, l'interprétation est réalisée entre 2 et 4 jours post-injection et leur taille (environ 150 kDa), largement supérieure au seuil de la clairance rénale, entraine leur accumulation au niveau du foie. Leur demi-vie dans le sang est élevée (8 à 10 jours) et leur domaine Fc interagit avec des récepteurs cellulaires de surface, augmentant encore leur rétention dans la circulation sanguine et leur bruit de fond en imagerie (Chames *et al.,* 2009 ; Huang *et al.,* 2010). De plus, les radio-isotopes associés à ces anticorps classiques doivent présenter une demi-vie comparable (entre 79 et 100 heures), pouvant mener à des effets secondaires indésirables chez certains patients, et nécessitant une irradiation importante (20 à 40 mSv par scan). Les isotopes associés aux Nb présentent une demi-vie plus courte (68 minutes à 12h) et nécessitent une irradiation plus faible du patient (< 5 mSv). Les Nb sont donc des sondes prometteuses pour un diagnostic non-invasif et certains sont d'ailleurs en phase d'essais cliniques, notamment ceux impliqués dans le diagnostic du cancer du sein par PET-SCAN (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.,* 2013 ; De Meyer

et al., 2014). Bien que les Nb soient faiblement immunogènes grâce à leur haute identité de séquence par rapport aux VH humains, l'humanisation de Nb a tout de même été développée pour réduire encore au maximum le risque immunogène lors de leur utilisation en thérapie et en imagerie.

Il subsiste néanmoins quelques aspects négatifs dans ce type d'utilisation des Nb, comme leur accumulation au niveau des reins pendant les premières heures du traitement, rendant impossible une imagerie des reins et des tissus environnants comme ceux du pancréas par exemple. Pour permettre une diminution du signal et réduire l'accumulation des radio-isotopes au niveau du rein, l'utilisation d'un linker entre le Nb et le radio-isotope clivable par des enzymes rénales a été développée (Vaneycken *et al.,* 2011). L'augmentation de la demi-vie des Nb peut être augmentée par PEGylation (Harmsen *et al.,* 2007), par fusion à des peptides de demi-vie plus longue (HAPylation, PASylation), par la formation de Nb bispécifiques ciblant des protéines de demi-vie plus longue comme l'albumine (Roovers *et al.,* 2007) ou à leur bi- tri- ou pentamérisation (Nunez-Prado *et al.,* 2015).

3. Chaperonnes

Les Nb sont de plus en plus utilisés pour des études structurales, car ils participent à l'organisation intrinsèque de protéines instables (Abskharon *et al.,* 2014) et à la stabilisation de domaines flexibles ou de protéines multiplexes (Chaikuad *et al.,* 2014) et favorisent la solubilisation de protéines, aidant ainsi à leur cristallisation (Desmyter *et al.,* 2015 ; Helma *et al.,* 2015). La solubilité des Nb et leur haute affinité pour leur cible réduisent les risques d'obtention de cristaux de Nb non complexés. La présence de Nb permet d'augmenter le nombre de protéines correctement repliées à l'intérieur du cristal, réduisant l'hétérogénéité conformationelle du cristal et augmentant sa qualité (Loris *et al.,* 2003). Ils peuvent même servir à masquer des peptides entrainant l'agrégation ou l'oligomérisation de certaines protéines (Domanska *et al.,* 2011 ; Baranova *et al.,* 2012) ou à étendre la surface hydrophobe nécessaire à l'assemblage des protéines en cristal (Rasmussen *et al.,* 2011). Ils ont aussi favorisé la cristallisation de protéines membranaires et de protéines à des stades conformationnels transitoires (Rasmussen *et al.,* 2011). Un protocole pour l'utilisation de Nb en tant que chaperonnes de cristallographie a même été développé pour l'obtention de structure cristallographique de protéines en six à douze mois (Pardon *et al.,* 2014). Les Nb

pour lesquels le site de fixation de l'antigène est connu peuvent aussi permettre le *mapping* de protéines ou de domaines protéiques par cryo-électromicroscopie (Schotte *et al.,* 2015). En comparaison, les scFv sont moins avantageux en tant que chaperonnes de cristallisation à cause de leur flexibilité intrinsèque, due au linker entre les domaines VH et VL (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.,* 2013). Les Nb étant stables et facilement immobilisables sur des supports solides, ils peuvent aussi aider à améliorer la purification de certaines protéines par colonne d'affinité, en diminuant la proportion de contaminants néfastes à la formation de cristaux purs. Ils peuvent également aider à l'étude de complexes par immunoprécipitation (Rothbauer *et al.,* 2008) et ont été utilisés pour du ChIP-on-chip (*chromatin immunoprecipitation with DNA microarrays*) pour la capture de protéines capables de lier de l'ADN comme des facteurs de transcription (Nguyen-Duc *et al.,* 2013).

4. Modulation de cibles

La conformation de certaines protéines a un lien direct avec leur localisation et leur fonction au sein de la cellule. La modulation de la conformation de protéines par les Nb est donc intéressante pour leur caractérisation (Helma *et al.,* 2015). Dans ce cadre, les Nb ont été exploités comme immuno-modulateurs produits *in vivo* (intrabodies) pour interférer avec la conformation des protéines, leur localisation et leur fonction (De Meyer *et al.,* 2014). Ils ont par exemple servi à moduler la fluorescence de la GFP (Rothbauer *et al.,* 2008), inhiber la *potato starch branching enzyme A*, en ciblant son site actif, agissant comme un inhibiteur allostérique (Jobling *et al.,* 2003), ou même activer une enzyme prostatique, probablement en la stabilisant dans une conformation favorable (Saerens *et al.,* 2004). Ils peuvent aussi permettre de visualiser des interactions protéine/protéine (Katoh *et al .,* 2015 ; Groll *et al.,* 2015) ou la translocation de récepteurs (Kirchhofer *et al.,* 2010). Ils sont capables de relocaliser des protéines ou des organelles (Borg *et al.,* 2015 ; Pollithy *et al.,* 2011) et d'induire la dégradation de protéines cibles par le protéasome par l'ajout d'un domaine F-box aux Nb (Caussinus *et al.,* 2011). Lorsque l'épitope reconnu est situé à l'interface d'un domaine d'interaction entre protéines ou à l'intérieur d'une sous-unité protéique, les Nb peuvent être utilisé pour perturber cette interaction (Koromyslova *et al.,* 2015). Ces capacités de modulation sont très intéressantes en biologie cellulaire pour caractériser une protéine et mesurer l'impact de sa modulation au niveau cellulaire. L'application de ces capacités de modulation au domaine thérapeutique est plus difficile, car les composés ciblés

sont intracellulaires et posent donc la question de l'adressage des Nb dans les cellules affectées. Pour pallier à ce problème, des outils permettant aux Nb d'atteindre le cytosol ont dû être développés. Dans ce cadre, des Nb ont été fusionnés à des peptides permettant leur translocation au travers de la membrane cellulaire, afin d'atteindre leur cible cellulaire (Wesolowski *et al.,* 2009).

5. Environnement et agroalimentaire

Les Nb ont également un intérêt en bioremédiation et permettent la détection dans différents environnements (sols, eaux) de marqueurs de bioremédiation. Par exemple, ils ont permis la mise en évidence de l'enzyme biphényl 2,3 dioxygénase impliquée dans la dégradation du biphényl, un composé nocif pour l'environnement, dans une usine de traitement de déchets pétroliers (Fraile *et al.,* 2013). D'autres Nb ont été développés pour caractériser la présence d'algues chlorophycées dans l'eau, qui indiquent généralement des eaux pauvres en oxygène et de concentration en nitrate élevée (Jiang *et al.,* 2014). Dans le secteur de l'agriculture, des Nb spécifiques de plante ou d'insectes ont été développés par la compagnie Agrosavfe dans le but de restreindre l'action de produits de traitements phytosanitaires au niveau des plantes d'intérêt, afin de réduire les quantités appliquées et la contamination des sols. Ces Nb peuvent se fixer par exemple aux trichomes, aux stomates ou à la surface des feuilles. Ils sont associés à des "agrocapsules" contenant les substances phyto-actives qui seront libérées de façon spécifique et limitée à la plante elle-même (De Meyer *et al.,* 2014). Les Nb présentent également un avantage dans le domaine agroalimentaire pour la détection de mycotoxines impliquées dans des intoxications alimentaires (Liu *et al.,* 2015) et ont permis la détection de différents sérotypes de toxine botulique dans le jus d'orange ou le cola (Conway *et al.,* 2010) ou de *Listeria monocytogenes* dans du lait (Tu *et al.,* 2016).

6. Diagnostic

Les Nb présentent indubitablement des avantages pour le développement d'outils de diagnostic. Outre leur capacité à cibler des épitopes conservés non accessibles aux anticorps conventionnels, ils présentent des avantages en termes de stabilité, d'affinité et de facilité de production à grande échelle. Ils sont également facilement modifiables pour augmenter

leur affinité ou leur valence, pour les fusionner à des protéines reportrices comme les protéines fluorescentes ou les enzymes, ou pour orienter leur immobilisation sur un support solide. Les étapes de leur sélection permettent également de réduire les risques de réactions croisées (Huang *et al*., 2010). Plusieurs DAS-ELISA à base de Nb ont été développés pour permettre la détection de toxines ou de virus, présentant généralement une limite de détection autour du ng/ml jusqu'à 0.05 ng/ml (Rossotti *et al.,* 2015 ; Liu *et al.,* 2015). La capacité des Nb à cibler un épitope cryptique a permis le développement d'un test de diagnostic contre les trypanosomes impliqués dans la maladie du sommeil. Le problème majeur du test préexistant était que le pathogène trouvait rapidement un moyen de muter ses glycoprotéines de surface pour échapper aux anticorps conventionnels. Les Nb développés ont pu pénétrer cette enveloppe de glycoprotéines pour cibler un épitope enfoui conservé qui n'était pas accessible aux anticorps conventionnels, augmentant la fiabilité et le spectre de ce test (Stijlemans *et al.,* 2004). Il existe aussi désormais un moyen d'estimer l'exposition au vecteur des trypanosomes, grâce à un Nb dirigé cette fois contre une protéine de la salive de mouche tsé-tsé qui a permis le diagnostic de piqûres présentes sur la peau de mammifères par ELISA compétitif (Caljon *et al.,* 2015).

Les Nb ont également été exploités en immuno-PCR pour la détection de marqueurs de cancers comme l'alpha-fetoprotéine (AFP), pour permettre la capture de cette protéine. Cette méthode a été comparée à un TAS-ELISA composé de Nb anti-AFP et présente un seuil de détection 100 fois plus bas que le TAS-ELISA, permettant ainsi un diagnostic plus précoce, élément clef dans la prévention des cancers (Chen *et al.,* 2016). Un Nb fusionné à la GFP a également permis le développement d'expérimentations par résonance plasmonique de surface, suite à l'évaluation de différents supports et conditions d'expérimentations, montrant l'intérêt de la taille des Nb pour ce type de technique (Della Pia et Martinez, 2015). Un système microfluidique ampérométrique a également été développé grâce à la capacité de fixation des Nb sur une bille magnétique sans altération de sa reconnaissance de l'antigène, où la mesure du courant électrique passant entre deux électrodes sous un champs magnétique permet de mettre en évidence la présence de fibrinogène dans le plasma humain, surveillée en cas de syndrome inflammatoire et impliquée dans les maladies cardio-vasculaires (Campuzano *et al.,* 2014). Les V-NAR sont encore une fois peu exploités en diagnostic (quatre cibles décrites) et permettent aussi la détection de ricine ou de la toxine botulique (Marshal et Porter, 2015).

A. Diagnostic viral et phytodiagnostic

Les virus présentent souvent des épitopes masqués à la surface de la capside virale ou de leur enveloppe, comme ceux au fond d'invaginations ou de canyons. Ces épitopes généralement fortement conservés peuvent permettre la liaison aux récepteurs de leurs cellules cibles. Ces épitopes concaves sont inaccessibles aux anticorps classiques et sont les cibles privilégiées des Nb. Ainsi, des tests immunologiques ont été développés, pour permettre la détection de virus nocifs pour la santé humaine. Par exemple, un DAS-ELISA permettant la détection rapide, sensible et à moindre coût du virus H5N1 de la grippe a été mis au point (Zhu *et al.,* 2014). Ce test est basé sur deux Nb, dont l'un est biotinylé *in vivo* au cours de sa production en bactéries, permettant son adsorption orientée dans les puits de la plaque ELISA recouverts de streptavidine et la capture des particules virales, et l'autre, couplé à la peroxydase de raifort (HRP), permet la détection de l'antigène et la révélation du test. De la même façon, ce type de test a été développé pour la détection d'un autre sérotype de la grippe (H7N2) par Gong et ses collaborateurs (2015). La capacité de fixation des Nb sur un support solide a également été exploitée pour la détection du *Porcine circovirus* de type 2 à l'aide de billes magnétiques et de quantum dots (Yang *et al.,* 2015) ou pour sa fixation sur du graphène, pour permettre la sélection des leucocytes dans un échantillon sanguin (Chen *et al.,* 2015). Les Nb étant facilement modifiables, ils peuvent aussi être couplés à des billes d'or pour leur utilisation en *striptest*, montrant une sensibilité supérieure aux anticorps monoclonaux pour la détection du virus de la dengue par ce type de test (Fatima *et al.,* 2014). Ils peuvent aussi être directement fusionnés à des enzymes utilisées pour la révélation des ELISA comme la phosphatase alcaline (PAL) (Sherwood *et al.,* 2007 ; Swain *et al.,* 2011). Quatre Nb ont été sélectionnés à partir d'une banque naïve contre le virus de Marbourg à l'origine de fièvres hémorragiques et permettent la détection de trois variants de ce virus, sans cross-réaction avec le virus Ebola, par test ELISA. La présence de virus dans un échantillon est révélée grâce à des Nb-PAL et la dégradation du substrat en un produit luminescent (Sherwood *et al.,* 2007). Ce test a été entièrement développé en trois semaines dans un laboratoire de sécurité sanitaire de niveau 4, montrant son efficacité en un temps de développement court, ce qui serait un avantage dans le cas de l'émergence d'un nouveau virus pouvant engendrer une pandémie. Les Nb permettent la détection de plus en plus d'agents pathogènes avec spécificité et large spectre et il semble possible de développer un test de diagnostic fiable dans un temps limité. Des Nb ayant également été développé pour permettre le diagnostique d'agents biologiques dangereux comme l'anthrax

(Walper *et al.,* 2014), la ricine (Anderson *et al.,* 2008) et même de composés explosif comme la TNT (Anderson *et al.,* 2008), l'intérêt pour les Nb commence à s'étendre au domaine de la défense et de la sécurité, et c'est pourquoi certains gouvernements, dont le gouvernement américain, s'intéressent au développement de Nb en tant qu'outils de diagnostic pour lutter contre le bioterrorisme.

Parmi toutes ces applications, le diagnostic phytosanitaire représente un marché économiquement moins important. De ce fait, les Nb n'ont pour le moment que peu été développés contre des virus de plantes bien que ceux-ci soient parfois à l'origine d'innombrables pertes agricoles. Il existe cependant des Nb contre le *Tulip virus X* (TuVX), un virus filamenteux à ARN positif responsable de chlorose ou de nécrose des pétales et des sépales de la tulipe. Ce virus est considéré comme virus de quarantaine en Hollande et fait l'objet d'environ 7000 tests par an dans ce pays. Des Nb développés contre le TuVX ont permis le développement d'un TAS-ELISA hybride, utilisant des anticorps polyclonaux en coating, des Nb pour la détection et des anticorps monoclonaux pour la révélation du test (Beekwilder *et al.,* 2008). Ces Nbs sont capables de détecter avec spécificité la présence de TuVX dans des extraits de feuilles sans cross-réactivité avec d'autres *Flexiviridae*. Des Nb ont également été développés contre le *Broad bean mottle virus*, un virus icosaédrique infectant le pois, le pois chiche et les fèves, et pouvant induire jusqu'à 55% de perte de la récolte. Ces Nb atténuent la propagation du virus dans les plantes *Vicia faba* et montrent des capacités de neutralisation du virus, ouvrant la voie à l'obtention de plantes résistantes (Ghannam *et al.,* 2015). C'est dans cette même optique qu'ont été développés dans l'équipe de Christophe Ritzenthaler à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes et dans l'équipe d'Olivier Lemaire à l'INRA de Colmar, des Nb anti-GFLV dont les capacités de neutralisation du virus ont fait l'objet d'une publication (Hemmer *et al.,* 2016) et de la thèse de Caroline Hemmer (2015). L'étude de cette capacité de reconnaissance des Nb pour le GFLV a donc naturellement été poursuivie dans le développement d'un test de diagnostic du GFLV composé intégralement de Nb.

Résultats

Chapitre IV. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic du *Grapevine fanleaf virus*

Nb	famille	aa	Mm (kDa)
23	1	159	17,0
101		159	17,1
126		159	17,1
p71		159	17,2
p75		159	17,1
37	2	154	16,6
77		154	16,4
171		154	16,4
p59		154	16,5
125	3	155	17,0
159		155	16,9
p25		155	16,9
15	4	157	17,2
p77		157	17,1
34	5	163	17,3
80		163	17,4
155	6	153	16,7
172		153	16,6
38	7	149	16,1
122	8	157	17,2
137	9	148	15,8
139	10	156	16,9
p12	11	156	16,9

Tableau 4.1. Classification de 23 Nb anti-GFLV obtenus après l'immunisation d'un dromadaire en 11 familles différentes, sur la base de la similarité de séquence du CDR3, qui correspond au domaine majeur de reconnaissance de l'antigène. Les Nb d'une même famille reconnaissent généralement le même épitope mais avec des affinités potentiellement différentes, alors que deux Nb de familles différentes reconnaissent généralement deux épitopes différents. Mm = Masse moléculaire; aa= nombre d'acides aminés.

Chapitre IV. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic du *Grapevine fanleaf virus*

Lors de mon arrivée au laboratoire, 23 Nb anti-GFLV issus d'une immunisation d'un dromadaire avaient été identifiés et classés en 11 familles (tableau 4.1). Ces Nb n'avaient que peu été caractérisés pour leur reconnaissance d'isolats différents de GFLV et n'avaient été utilisés comme réactif de détection en ELISA qu'associé à des anticorps anti-6His couplés à la phosphatase alcaline. Ces Nb anti-GFLV ont été exploités et modifiés à façon au cours de ma thèse, dans le but de développer un DAS-ELISA anti-GFLV composé uniquement de Nb.

I. Évaluation de la capacité de reconnaissance du GFLV par les Nb

1. Étiquetage et production des Nb anti-GFLV

La grande stabilité et solubilité des Nb permettent leur production en masse dans de nombreux organismes différents (De Meyer *et al*., 2014) et notamment dans le périplasme de bactéries *E. coli*. La présence d'un peptide signal pelB, présent en amont de la séquence des Nb, permet leur adressage vers le périplasme bactérien, favorisant leur structuration et leur repliement corrects dans cet environnement oxydant. Ce système de production favorise également la réduction de la contamination des extraits par des protéines bactériennes après extraction périplasmique, les protéines bactériennes étant dix fois moins abondantes dans le périplasme que dans le cytoplasme (Quan, 2013). Afin de purifier et d'utiliser les Nb comme réactif de détection lors d'un ELISA, les 23 Nb anti-GFLV disponibles ont été clonés pour présenter le peptide signal pelB en N-terminal et une étiquette 6His-StrepTagII en C-terminal. Les fragments PCR amplifiés ont été recombinés avec un vecteur d'entrée (pDonR) puis avec un vecteur d'expression bactérienne (p0GwA) selon la technologie Gateway. Deux types de bactéries et deux milieux de cultures différents ont été testés afin d'optimiser le rendement de production des Nb, à savoir les bactéries BL21(DE3) et soluBL21 d'une part, et les milieux TB et auto-inductible NZY d'autre part. Le milieu TB est un milieu LB enrichi qui permet d'atteindre des densités optiques (DO_{600nm}) bactériennes élevées (jusqu'à 20 de DO) et donc une biomasse bactérienne plus importante que le milieu de culture LB. La plus grande proportion de tryptone et d'extrait de levures contenus dans ce milieu fournit des nutriments supplémentaires et des facteurs de croissance favorisant le

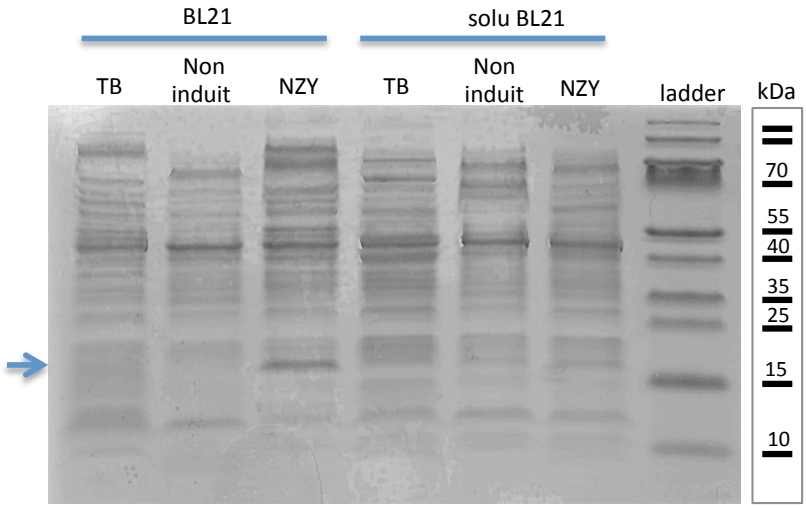


Figure 4.1. Analyse de fractions protéiques périplasmiques issues de la production du Nb 23-6HisST en bactéries BL21(DE3) et soluBL21, cultivées dans en milieux NZY et TB, par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine et coloration des protéines au bleu de Coomassie. La taille attendue du Nb23-6HisST (18kDa) est indiquée par une flèche bleue. L'échelle de poids moléculaires du *ladder* est indiquée en kDa à droite de la figure.

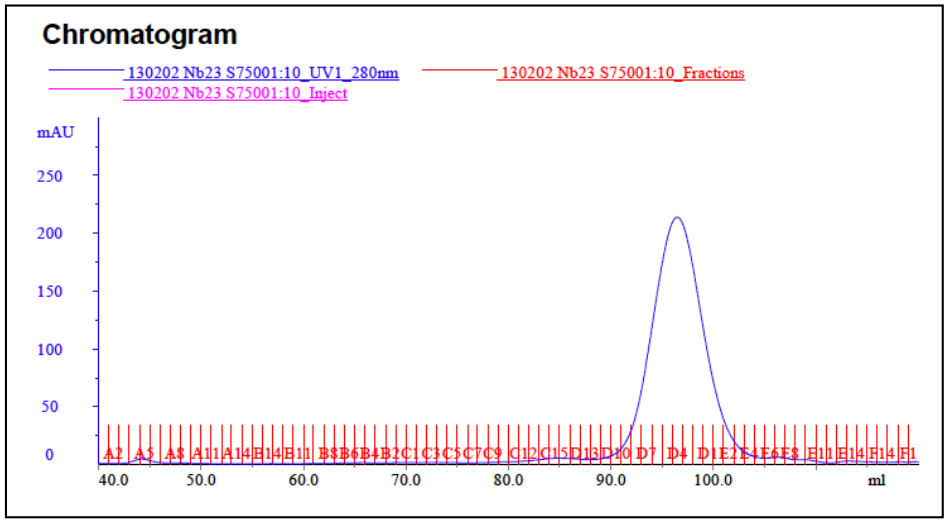


Figure 4.2. Pic d'élution du Nb 23-6HisST après gel filtration sur colonne Sephadex S-75, assistée par l'appareil Äkta Purifier sous le logiciel Unicorn. Les barres verticales rouges correspondent aux différentes fractions récoltées à la sortie de la filtration sur gel. Le pic unique indique la présence d'une seule population de protéines et donne une indication sur l'homogénéité et la quantité de Nb produit.

développement bactérien. Le potassium ainsi que les phosphates sont présents pour maintenir le pH du milieu de culture au cours de la production. À la différence du milieu TB, le milieu NZY présente l'avantage de ne pas nécessiter la surveillance de la croissance cellulaire, ni l'induction de la production des protéines par addition d'IPTG. Le glucose présent dans le milieu NZY est métabolisé préférentiellement par les bactéries en croissance, réprimant l'opéron lactose et la production des Nb sous cet opéron. Lorsque l'ensemble du glucose est épuisé, le lactose, également présent dans le milieu NZY, sera à son tour métabolisé, induisant l'opéron lactose et donc la production des protéines. La production du Nb 23 portant une étiquette 6 His et StrepTag II (Nb-6HisST) par les deux souches bactériennes et les deux milieux décrits précédemment, a été évaluée à partir de cultures bactériennes de 500 ml (figure 4.1). Les extraits périplasmiques issus de ces différentes productions ont été analysés par électrophorèse sur gel Tris-Tricine après coloration des protéines au bleu de Coomassie. Sur la base de l'analyse de ce gel dénaturant, la production semble nettement supérieure après production en bactéries BL21 et milieu NZY qu'après production en bactéries SoluBL21 ou en milieu TB. La production des Nb-6HisST a donc été poursuivie par sécrétion périplasmique en bactéries BL21 suivie d'une extraction par choc osmotique et d'une purification par chromatographie d'affinité (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography, IMAC) de type HisTrap, suivie d'une filtration sur gel sur colonne S75 (Size Exclusion Chromatographie, SEC). Les chromatographies IMAC et SEC sont assistées par l'appareil Äkta Purifier (GE Healthcare) piloté par ordinateur sous le logiciel Unicorn (GE Healthcare). À la sortie de la SEC, la majorité des Nb produits sont rassemblés dans quelques fractions formant un pic d'élution unique, suggérant la présence d'une seule population de protéines et d'une probable purification à homogénéité du Nb (figure 4.2).

Les rendements de purification obtenus sont variables (tableau 4.2) et dépendent essentiellement de l'efficacité de l'expression par les bactéries *E. coli*. Il existe des disparités de rendement de production des Nb-6HisST à l'intérieur d'une même famille. Ainsi, le Nb p71 de la famille 1 se produit jusqu'à six fois plus que d'autres Nb appartenant à la même famille tel que les Nb 23 et 126. De même, le Nb p59 (famille 2) est produit jusqu'à 28 fois plus que les autres Nb de cette même famille. Il existe aussi des différences d'efficacité de production entre les différentes familles. D'une manière générale, les Nb de la famille 1 se produisent facilement contrairement à ceux de la famille 3, qui se caractérisent par un rendement faible. Les Nb de la famille 3 n'étant produits qu'en très faible quantité par

Famille	Nb	Rendement (mg/L)
1	23	1.8
	101	5.0
	126	1.9
	p71	11.0
	p75	8.0
2	37	0.6
	77	0.3
	171	1.0
	p59	8.6
3	125	0.3
	159	0.3
	p25	<0.05
4	15	5.0
	p77	2.3
5	34	<0.05
	80	2.4
6	155	0.6
	172	1.4
7	38	0.5
8	122	4.4
9	137	0.6
10	139	<0.05
11	p12	1.3

Tableau 4.2. Rendement moyen de production des Nb-6HisST. L'ensemble de ces Nb a été produit en bactéries BL21 sauf les Nb de la famille 3, produits en bactéries SHuffle. Les rendements de purification sont variables et dépendent essentiellement de l'efficacité de l'expression des Nb dans *E. coli*.

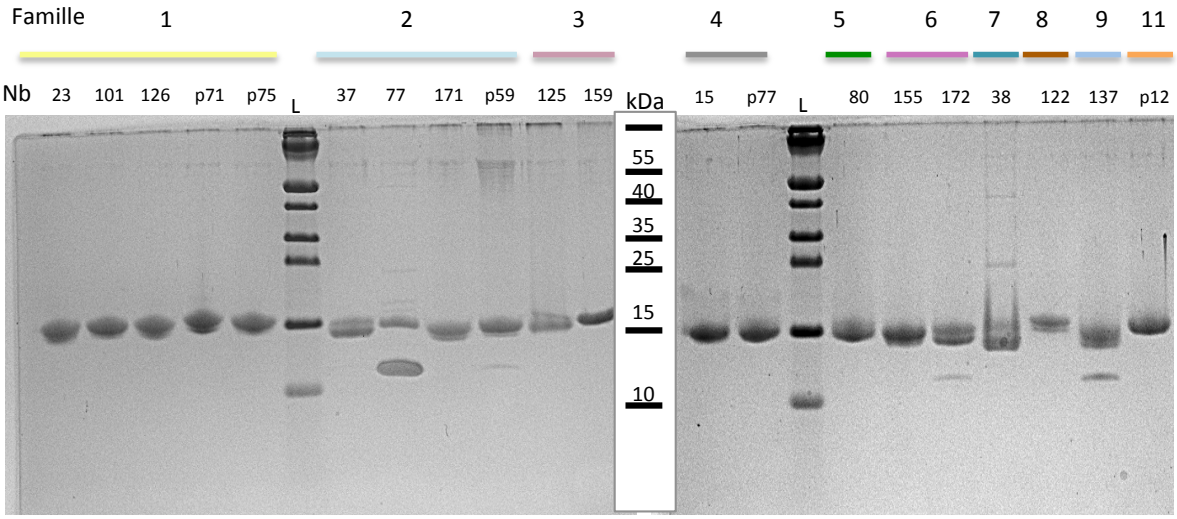


Figure 4.3. Analyse de 20 Nb-6HisST purifiés par chromatographie d'affinité et gel filtration, produits à partir des bactéries BL21 ou SHuffle, ajustés à 1µg/µl, sur gel dénaturant Tris-Tricine et coloration des protéines au bleu de Coomassie. L = ladder ; l'échelle de poids moléculaires du *ladder* est indiquée en kDa entre les deux gels.

sécrétion périplasmique (<0,1 mg/L de culture), une production cytoplasmique de ces Nb a été menée. Pour cela, le peptide signal pelB a été remplacé par une méthionine dans les vecteurs d'expression, puis, les Nb ont été produits à partir de bactéries SHuffle par induction tardive en milieu TB, afin d'améliorer leur rendement. La souche de bactéries SHuffle (Zarschler *et al*., 2013) porte deux mutations dans les gènes codant pour la thioredoxine réductase (trxB) et la glutathione réductase (gor) favorisant la formation de ponts disulfure dans le cytoplasme. Elle exprime également la disulfure isomérase DsbC qui participe au repliement correct des protéines. La répression lacI permet aux protéines toxiques d'être exprimées dans ces bactéries et améliore leur rendement de production lors d'une induction tardive à l'IPTG. Dans le cas des Nb de la famille 3, la production en bactéries SHuffle a permis d'améliorer d'un facteur 4 le rendement de Nb purifiés par rapport à la production périplasmique en BL21 (65 µg en bactéries BL21 contre 260 µg en bactéries SHuffle) mais ne permet toujours pas d'atteindre de très fort rendement de production et de purification. Bien qu'extraits du cytoplasme, ces Nb ont été purifiés à quasi-homogénéité après chromatographie d'affinité et gel filtration, comme le montre le gel Tris-Tricine après coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 4.3). L'ensemble des Nb ainsi purifiés a été concentré à 1 mg/ml en utilisant des Centricons® (Merck Milipore, seuil d'exclusion 5kDa) et additionné d'azide à 0,01% pour une conservation à 4°C. Seuls trois Nb-6HisST n'ont pas pu être purifiés en quantité suffisante pour poursuivre leur caractérisation ; il s'agit des Nb p25 famille 3, Nb 34 famille 5 et Nb 139 famille 10. De manière générale, les Nb se produisant dans les plus grandes quantités avec facilité sont les plus intéressants dans le développement d'un kit de diagnostic destiné à la commercialisation.

2. Caractérisation des Nb étiquetés produits

A. Reconnaissance de la souche de référence, le GFLV-F13

La capacité de reconnaissance des Nb-6HisST a d'abord été évaluée en ELISA direct contre des particules virales purifiées de GFLV-F13, la souche utilisée pour l'immunisation du dromadaire ayant servie à l'obtention des Nb anti-GFLV. Lors de ce test, les particules virales purifiées sont déposées dans les puits de la plaque ELISA à raison de 70 ng par puits. La révélation de la présence de particules virales est réalisée à l'aide des Nb-6HisST via la StrepTactine® ou la Streptavidine, toutes les deux commercialisées sous forme couplées à la Phosphatase alcaline (respectivement Strep-PAL (Iba GMBH, Germany) et Sav-PAL (Jackson

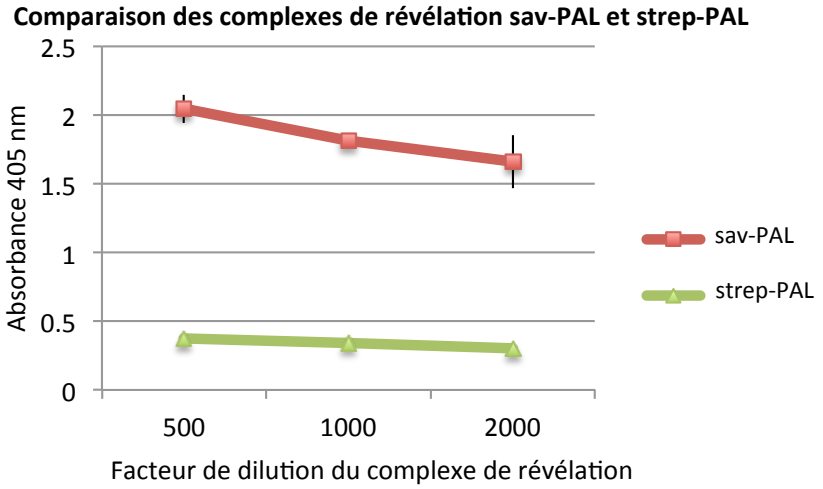


Figure 4.4. Détection par ELISA direct du GFLV-F13 purifié par le Nb 23-6HisST dilué au 1:100, en utilisant de deux complexes de révélation composés de Streptavidine (sav) ou de Strep-Tactine (strep) couplés à la phosphatase alcaline (PAL).

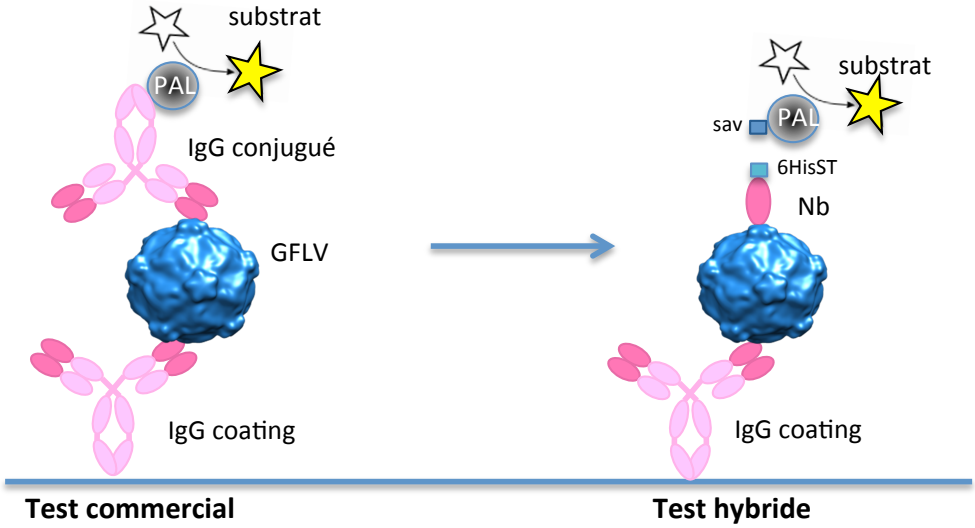


Figure 4.5. Description d'un ELISA hybride permettant la caractérisation du spectre des Nb-6HisST produits. Les particules virales sont capturées par les anticorps commerciaux et leur présence est révélée par les Nb-6HisST et le complexe sav-PAL. Ce test comporte une étape supplémentaire par rapport à l'ELISA classique, à savoir, le dépôt de la sav-PAL dans les puits.

ImmunoResearch). La formation du complexe Nb-6HisST/Sav-PAL ou Nb-6HisST/Strep-PAL permet la révélation de l'ELISA suite à la dégradation du substrat pNPP. Cette approche ajoute une étape supplémentaire comparée aux kits de diagnostic disponibles sur le marché. En effet, ces kits sont composés d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux directement conjugués à la phosphatase alcaline. Cette étape supplémentaire est classiquement réalisée en ELISA pour les tests comprenant des anticorps biotinylés (Crowther, 2001). Dans le cadre d'une détection du GFLV-F13 purifié par les Nb-6HisST, le complexe streptavidine-PAL a été comparé au complexe StrepTactine-PAL lors de la révélation du test. Les deux complexes de révélation présentent des affinités différentes pour le Strep-TagII (présent en C-terminal des Nb) : la Strep-PAL a une affinité de 1 µM alors que Sav-PAL présente une affinité dix fois plus faible, autour de 100 µM (Voss et Skerra, 1997). La figure 4.4 illustre la détection du GFLV-F13 par le Nb 23-6HisST. Les résultats montrent que l'addition de l'étiquette 6HisST ne perturbe pas la détection du GFLV par les Nb, puisqu'un signal positif est obtenu dans les deux conditions testées. Contrairement à ce que les affinités de la StrepTactine® et de la Streptavidine pouvaient laisser penser, d'après les absorbance mesurées (figure 4.4), la révélation du test par le complexe Sav-PAL s'avère nettement supérieure à celle réalisée grâce au complexe Strep-PAL. La différence de signal mesurée en ELISA pourrait peut être s'expliquer par le nombre plus élevé de PAL par molécule de streptavidine comparé à la StrepTactine®, par la différence d'activité enzymatique des PAL associées à ces deux types de protéines ou plus simplement par la différence de concentration préconisée pour les deux réactifs. Compte tenu de son efficacité dans la révélation de l'ELISA anti-GFLV, le complexe Sav-PAL a donc été utilisé dans les investigations ultérieures pour la révélation de l'ELISA comprenant des Nb-6HisST comme réactif de détection.

B. Caractérisation du spectre des Nb contre les collections de vignes infectées

Après validation de la reconnaissance de la souche de référence GFLV-F13 en ELISA direct, j'ai cherché à identifier parmi les Nb purifiés, ceux présentant le spectre de reconnaissance le plus large. En effet, comme décrit dans le chapitre 2, un élément clef d'une méthode de diagnostic est sa capacité de reconnaissance d'un pathogène avec sensibilité, spécificité et large spectre. Dans le cadre d'un test de diagnostic contre le GFLV, le ou les Nb choisis comme réactifs doivent permettre la détection du plus grand nombre de variants naturels de GFLV, sans reconnaissance croisée avec d'autres népovirus proches, tels

que l'ArMV. Pour cela, les 20 Nb-6HisST purifiés ont été testés en DAS-ELISA selon la procédure hybride décrite figure 4.5. Cette procédure utilise les anticorps polyclonaux commerciaux anti-GFLV présents dans le kit de détection Bioreba, connu pour être l'un des plus performants sur le marché pour la détection du GFLV. Ces anticorps anti-GFLV ont été utilisés pour capturer les différents isolats de GFLV des collections de vignes provenant de l'INRA de Colmar et de l'Institut Français de la vigne et du Vin (IFV ; Grau du Roi). L'ensemble de ces deux collections comporte 56 isolats de GFLV répertoriés (tableau 4.3) dont certains sont génétiquement caractérisés (Vigne *et al.,* 2004). Ces isolats ont été majoritairement collectés au vignoble, par rapport à la variabilité d'expression de leurs symptômes, puis ont été caractérisés par DAS-ELISA (INRA de Colmar) ou RT-PCR (IFV) et sont tous régulièrement testés par ELISA aussi bien à l'INRA de Colmar qu'à l'IFV. Une comparaison des protéines de capside de nombreux isolats, dont la séquence en acides aminés a été caractérisée et référencée dans GenBank, avec celles d'isolats caractérisés génétiquement de la collection de l'INRA de Colmar (indiqués par un rectangle de couleur figure 4.6) montre que les isolats de l'INRA de Colmar sont phylogénétiquement éloignés, indiquant qu'ils représentent une partie de la diversité des variants de GFLV au vignoble, et sont donc intéressants pour évaluer le spectre de détection des Nb. Les échantillons de feuilles de vigne à tester ont été prélevés au mois de juin 2013, période optimale de détection du GFLV sur vigne, avant les fortes chaleurs estivales.

Afin de pouvoir comparer les Nb entre eux, la détection des particules virales est effectuée à concentration constante de Sav-PAL (1 :10 000) et de chacun des Nb-6HisST (dilution au 1:100, soit 0,01 mg/ml). Le criblage de la collection de Colmar montre une diversité importante de la détection des isolats de GFLV par les Nb-6HisST. La famille majoritaire et notamment les Nb 23 et p75 présentent un spectre très large de reconnaissance des isolats et sont capables de détecter tous les isolats testés à l'exception de l'isolat GFLV-BYM47. Dans cette même famille, le spectre de reconnaissance est plus restreint pour les Nb p71, 101 et 126 (figure 4.7.A). Ce criblage montre aussi des différences de reconnaissance entre différentes familles de Nb. Ainsi, si les Nb de la famille majoritaire possèdent le spectre le plus large, le Nb p12, seul représentant de la famille 11 ne reconnait que deux isolats de la collection de l'INRA de Colmar en plus du GFLV-F13 (figure 4.7.A). Le criblage de la collection d'isolats de GFLV de l'IFV avec un représentant de 4 familles différentes confirme les résultats obtenus avec la collection de Colmar, et montre encore

Collection INRA de Colmar

Vitis	Isolat	*Origine*	Abréviation
Chardonnay	ARYM2 K89	*Colmar*	**ARYM2**
Kober 5BB	B844	*Colmar*	**B844**
Gewurztraminer	BE 5-19	*Bennwihr*	**BE 5-19**
Gewurztraminer	BE 5-39	*Bennwihr*	**BE 5-39**
Gewurztraminer	BE-4-11	*Bennwihr*	**BE-4-11**
Chardonnay	BYM47 K87	*Colmar*	**BYM47**
Cabernet franc	B715 N176	*Colmar*	**CF N176**
Cabernet franc	B844 N219	*Colmar*	**CF B844**
Cabernet franc	N845	*Colmar*	**CF N845**
Cabernet franc	B714 N88	*Colmar*	**CF N88**
Chardonnay	C1311	*Colmar*	**Ch. C13**
Chardonnay	E96	*Colmar*	**Ch. E96**
Chardonnay	H125	*Colmar*	**Ch. H125**
Chardonnay	H126	*Colmar*	**Ch. H126**
Chardonnay	T57	*Colmar*	**Ch. T57**
Chardonnay	T58	*Colmar*	**Ch. T58**
Chardonnay	T59	*Colmar*	**Ch. T59**
Chardonnay	T60	*Colmar*	**Ch. T60**
Kober 5BB	CH8617	*Changins*	**CH8619**
Kober 5BB	CH8673	*Changins*	**CH8673**
Kober 5BB	CO1	*Corroies*	**CO1**
Kober 5BB	CO1-CO2	*Colmar*	**CO1-CO2**
Kober 5BB	CO1-CO3	*Colmar*	**CO1-CO3**
Kober 5BB	CO2	*Corroies*	**CO2**
Kober 5BB	CO3	*Corroies*	**CO3**
Kober 5BB	CO4	*Corroies*	**CO4**
Kober 5BB	F13	*Colmar*	**F13**
Gewurztraminer	B865 TS6	*Colmar*	**G. B865**
Chardonnay	GHu	*Colmar*	**Ghu**
Hongrie	KyM5 K94	*Colmar*	**KyM5**
Alph Lavallée	N40	*Colmar*	**Lavallée**
Kober 5BB	Moet	*Colmar*	**Moet**
Panse Précoce	C1237	*Colmar*	**PP**
Servant	HG222	*Colmar*	**Servant**
Ugni Blanc	N210	*Colmar*	**Ub. N210**

Collection IFV

Cépage	Numéro	*Origine*	Abréviation
5BB	E28	*Colmar*	**5BB E28**
Cab. Franc	E248	*INRA Bordeaux*	**CF E248**
Chasselas	E241	*Changins n°172*	**Chas. E241**
Chasselas	E242	*Changins*	**Chas. E242**
Gamay	E521	*Changins n°175*	**Gam. E521**
Grenache	E69	*entav (CA84)*	**Gre. N E69**
Molette	E7	*entav*	**Mol. E7**
Mondeuse	E6	*entav Chambéry*	**Mon. E6**
Pinot Noir	E95	*entav Dijon*	**P.N E95**
Rupestris	E44	*Montpellier*	**Ru. E44**
Viognier	E25	*entav*	**V. E25**
Cab. franc	E247	*Colmar B 845*	**CF E247**
Chardonnay	E313	*Colmar8 H3*	**Ch. E313**
Chardonnay	E338	*Colmar TH*	**Ch. E338**
Chardonnay	E341	*Changins n°198*	**Ch. E341**
Chardonnay	E348	*entav Octon*	**Ch. E348**
Chardonnay	E349	*entav Octon*	**Ch. E349**

Tableau 4.3. Liste des isolats de GFLV provenant des collections de vignes infectées disponibles à l'INRA de Colmar et à l'Institut Français de la Vigne et du vin, regroupant respectivement 35 et 17 échantillons. La colonne des abréviations indique les noms sous lesquels ces isolats de GFLV sont identifiés dans ce chapitre.

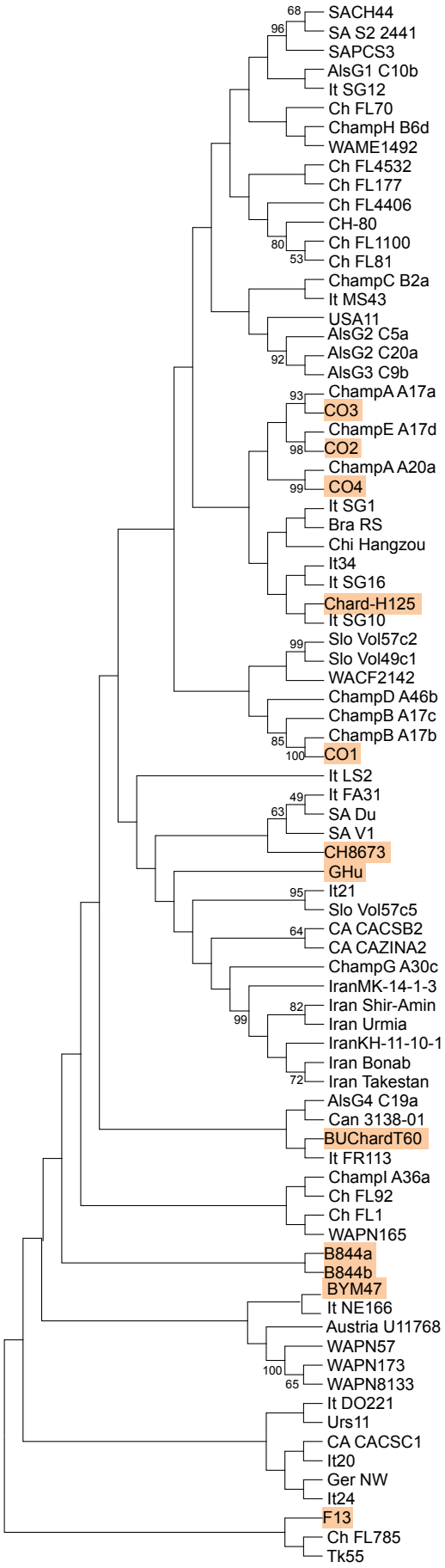


Figure 4.6. Arbre phylogénétique représentant la diversité de séquences en acides aminés de 82 protéines de capside complètes d'isolats différents de GFLV (504 acides aminés), disponibles dans la base de données GenBank et provenant de diverses origines géographiques. En orange sont surlignés les isolats disponibles à l'INRA de Colmar. La provenance et les références de l'ensemble des isolats sont présentés en annexe 3. L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode de Neighbor-Joining et les valeurs de *bootstrap* supérieures à 50% sont affichées au niveau des différents embranchements. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de correction de Poisson et les analyses ont été menées grâce au logiciel MEGA7.

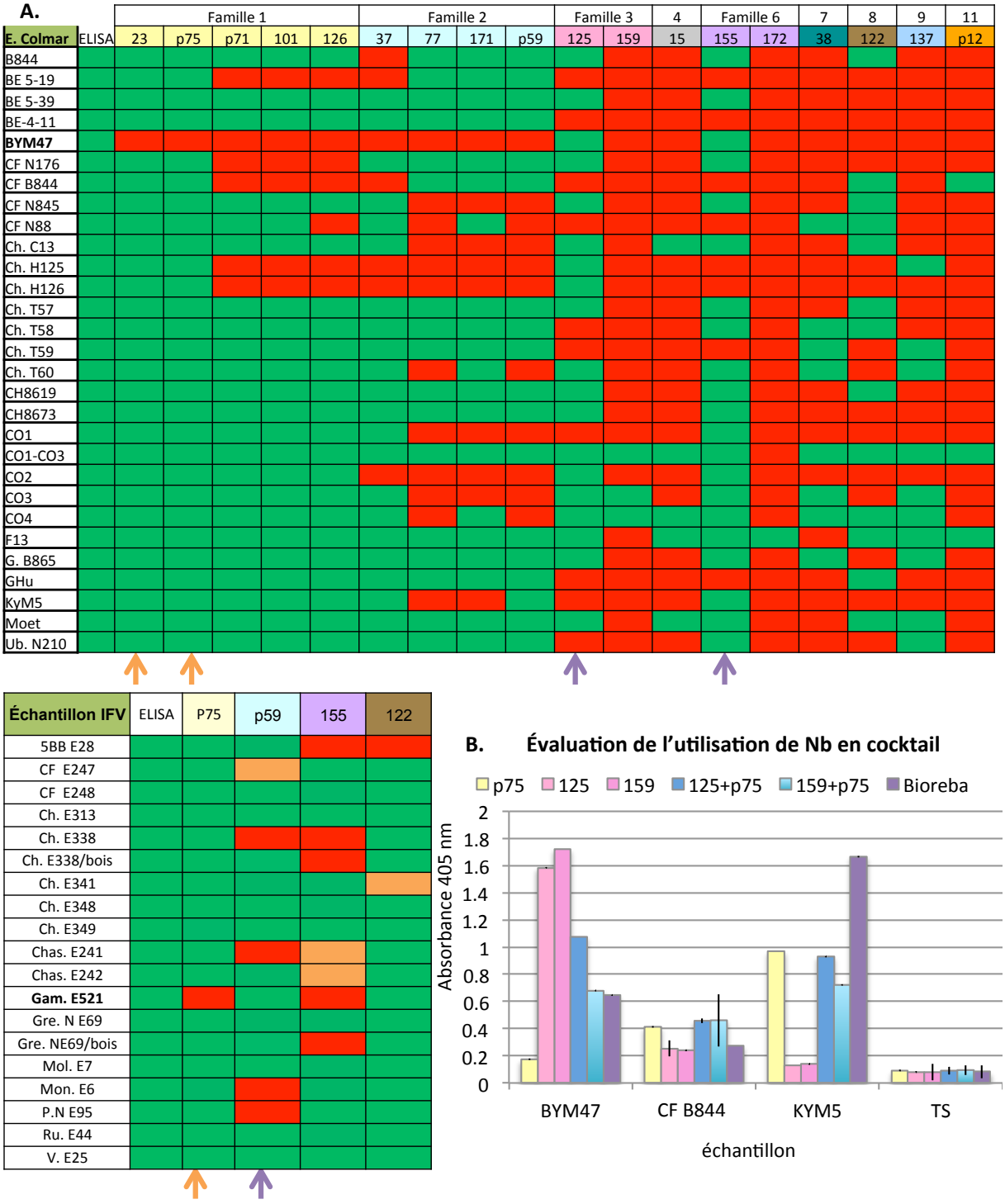


Figure 4.7. **(A) Spectre de reconnaissance des différents Nb testés** contre des échantillons de vignes infectées par le GFLV de la collection de l'INRA de Colmar et de l'IFV. Les rectangles verts correspondent à la détection de l'isolat par les Nb ; les rouges à une absence de détection et les oranges une détection indéterminée. Les flèches oranges signalent les Nb ayant le spectre de reconnaissance le plus large. Les flèches violettes indiquent les Nb permettant de complémenter le spectre de détection des Nb de la famille majoritaire. La colonne ELISA correspond au kit commercial Bioreba. **(B)** Détection de 3 isolats de GFLV provenant de vignes infectées par des Nb de deux familles différentes, seuls ou en combinaison, afin d'estimer la possibilité d'utilisation de Nb en cocktail pour couvrir le spectre du test commercial Bioreba.

une fois que le Nb p75, appartenant à la famille majoritaire, permet la détection de la majorité des isolats testés à l'exception de l'isolat Gamay E521. Les deux Nb de la famille 1, les Nb 23 et p75 indiqués par une flèche jaune, au spectre le plus large, semblent donc être intéressants pour développer un DAS-ELISA Nb, car ils sont probablement dirigés contre un épitope conservé dans la population virale de GFLV. Deux variants de GFLV ne sont pas reconnus par ces Nb de la famille majoritaire. Il s'agit de l'isolat GFLV-BYM47 de l'INRA de Colmar et de l'isolat GFLV-E521 de l'IFV. Néanmoins, l'isolat GFLV-BYM47 est reconnu par les Nb 159 et 125 de la famille 3 et le Nb 155 de la famille 6. L'isolat GFLV-E521 est reconnu par le Nb p59 (famille 2). Ainsi, les Nb 125 ou 155, en plus du Nb p59 (flèche violette, figure 4.7.A), et en combinaison avec un des Nb de la famille majoritaire, permettent la couverture du spectre de reconnaissance du kit commercial (colonne dénommé ELISA, figure 4.7.A).

Afin de vérifier que la combinaison de Nb de différentes familles permet d'avoir un spectre de reconnaissance complet, j'ai réalisé un DAS-ELISA hybride contre trois isolats de GFLV. D'après le premier criblage des collections, l'isolat GFLV-B844 est reconnu par les Nb de la famille majoritaire et par les Nb de la famille 3 ; l'isolat GFLV-BYM47 est reconnu par les Nb de la famille 3 mais pas par le Nbp75 ; et l'isolat GFLV-KYM5 est reconnu par le Nbp75 mais pas par les Nb de la famille 3. Afin de vérifier que l'association de Nb de différentes familles est compatible avec la détection du GFLV et permet de couvrir le spectre du kit commercial, un DAS-ELISA hybride a été réalisé contre les trois isolats de GFLV détaillés ci-dessus, en utilisant l'anticorps de coating commercial et les Nb p75, 125 et 159 seuls ou en combinaison comme réactif de détection (figure 4.7.B). Les résultats du criblage des collections sont confirmés pour chaque Nb seuls. Les mélanges de Nb125 et p75 ainsi que des Nb 159 et p75 permettent effectivement la détection des trois isolats de GFLV, suggérant la compatibilité et la complémentarité des différents Nb en tant que réactif de détection ELISA ainsi que leur capacité à couvrir le spectre du test commercial.

Lors de ce premier criblage j'ai également pu mettre en évidence que ces Nb anti-GFLV sont inefficaces pour la détection d'autres népovirus associés au court-noué de la vigne, en particulier l'ArMV, génétiquement proche du GFLV, ni d'un autre membre potentiel de la famille *Secoviridae*, le SLRV (résultats non montrés).

L'ensemble de ces résultats montre que les Nb étiquetés produits sont capables de reconnaitre de manière spécifique le GFLV dans un extrait brut de plante et qu'une combinaison de deux à trois Nb permet de couvrir l'ensemble du spectre d'isolats de GFLV. À ma connaissance, ceci est la première description de l'utilisation de Nb comme outil de détection d'un virus de vigne.

II. Développement des Nb comme réactifs de coating

Après avoir validé l'utilisation des Nb en détection, l'étape suivante était d'adapter les Nb pour l'étape de « coating », afin de capturer les particules virales sans altérer leur capacité de reconnaissance. La première approche a consisté à utiliser directement les Nb comme réactif de coating. Aucun signal positif n'a pu être observé en DAS-ELISA pour aucun des Nb-6HisST testés (résultats non montrés). Ceci s'explique probablement par la petite taille des Nb, qui fait que leur immobilisation sur la plaque ELISA s'effectue au détriment de leur capacité de capture de l'antigène. Une des stratégies pouvant permettre l'utilisation de Nb biotinylés comme réactif de « coating », consisterait à utiliser des plaques ELISA pré-coatées avec de la streptavidine pour permettre l'adsorption orientée des Nb-ST et la capture des antigènes (Zhu *et al*., 2014 ; Gong *et al.,* 2015). Cette stratégie aurait effectivement permis l'adsorption orientée des Nb-6HisST, mais pas leur utilisation en tant que réactif de détection associé à la Sav-PAL. De plus, le prix d'une plaque ELISA pré-coatée étant plus de dix à vingt fois supérieur (entre 40 et 50 euros) au prix d'une plaque standard, ceci augmenterait considérablement le coût d'un tel test diagnostic. L'utilisation d'une étiquette « myc » a également été envisagée pour permettre le coating orienté des Nb (De Meyer *et al.,* 2014) mais abandonnée pour les mêmes raisons de coût.

La fusion de Nb à une protéine porteuse afin d'en d'augmenter la taille et ainsi orienter leur adsorption sur la plaque ELISA pour la capture d'un antigène n'avait, à ma connaissance, que peu été évaluée (hormis les fusions au fragment Fc des anticorps ; Stijlemans *et al.,* 2011). J'ai ainsi testé le potentiel de coating en DAS-ELISA de deux protéines, la *Tag Red Fluorescent protein* (TagRFP) et la *glutathion S-transférase* (GST) en raison des propriétés fluorescentes et colorimétriques de la première (Merzlyak *et al.,* 2007) et de la capacité de la seconde à dimériser, à augmenter la solubilité et à faciliter la purification de protéines par chromatographie d'affinité (Mannervik *et al.,* 1988, Scheich *et al.,* 2003).

1. Clonage et Production des Nb-P

Afin d'obtenir des réactifs de coating fonctionnels, les Nb ont été fusionnés par leur extrémité C-terminale à deux protéines porteuses (Nb-P). Les fusions génétiques à la TagRFP ainsi qu'à la GST ont été réalisées par PCR chevauchantes et insérées dans le vecteur d'expression pet22 par clonage classique. Les fusions comprennent un peptide de liaison (*linker*) de sept acides aminés, $(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_3$ (nommé 3GS3G) entre le Nb et la protéine porteuse ainsi qu'une étiquette 6His en aval de cette dernière. Les protéines issues de la fusion des Nb à des fluorochromes tel que la TagRFP sont appelés Chromobodies® (Cb) et sont très utiles en imagerie (voir chapitre 3). Tout comme les IgG, la GST est une protéine dimérique capable de s'adsorber de manière orientée sur les plaques ELISA comme démontré par Desplancq *et al.* (2011) pour la fonctionnalisation de scFv. Le sens de fusion Nb-P a été choisi en se basant sur celui utilisé en phage display lors du criblage de la banque Nb (voir chapitre 3), mais également en raison des travaux antérieurs ayant démontré la fonctionnalité de Nb portant des fusions carboxy-terminales (Joosten *et al.,* 2005). Dans ces travaux, le gène codant pour la peroxydase d'*Arthromyces ramosus* (arp) a été fusionné du coté N ou C-terminal du VHH-R9 développé contre le colorant Reactive Red 6 (RR6). Les résultats ELISA ont clairement montré que les Nb ARP-R9 anti-RR6 (fusionnés du coté N-terminal) reconnaissent faiblement l'antigène, contrairement aux Nb R9-ARP (fusion C-terminale) dont la capacité de reconnaissance de l'antigène n'est que peu ou pas affectée par la fusion à l'ARP (Joosten *et al.,* 2005).

Des tentatives de production de Cb en bactéries dans les souches BL21(DE3), SoluBL21, Origami ainsi qu'en plantes après agro-infiltration avaient déjà été menées avant mon arrivée au laboratoire, mais n'avaient pas été couronnées de succès (thèse C. Hemmer, 2015). Le problème de la production de ce type de construction réside dans le fait que les deux protéines fusionnées nécessitent des conditions d'oxydo-réduction *a priori* incompatibles. En effet, les Nb étant stabilisés par des ponts disulfures, leur adressage au périplasme dans un environnement oxydatif favorise leur repliement correct. En revanche, les protéines fluorescentes généralement exprimées dans le cytoplasme ne sont pas fonctionnelles ou pas produites sous forme périplasmique (Feilmeier 2000 ; Dammeyer et Tinnefeld 2012). La production des Cb a été résolue par expression cytoplasmique en bactéries SHuffle (Zarschler *et al.,* 2013), la même souche que celle utilisée pour améliorer le rendement des Nb de la famille 3. Les Cb portent également une étiquette 6His en C-terminal de la protéine porteuse, ce qui a permis leur purification par affinité sur colonne

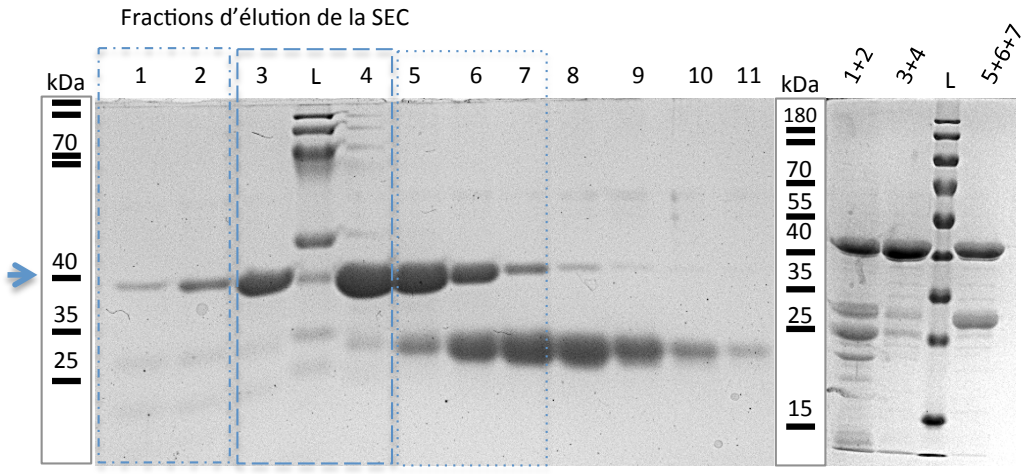


Figure 4.8. Analyse des fractions d'élution collectées après filtration sur gel du Cb 23 provenant d'une production en bactéries SHuffle, après électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine et coloration des protéines au bleu de Coomassie. La pureté des fractions étant variable, les fractions ont été rassemblées selon leur proportion de contaminants puis concentrées à 1 mg/ml. Le numéro des fractions rassemblées est indiquée en haut du gel de droite. L = ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche des deux gels.

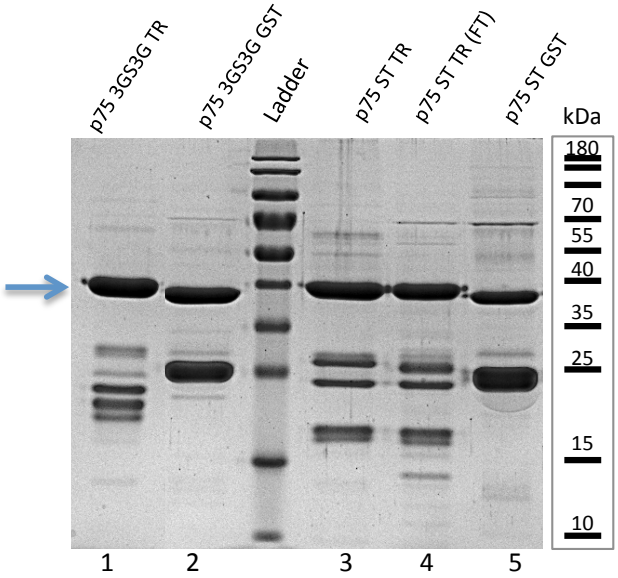


Figure 4.9. Analyse des protéines de fusion purifiées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie. Le Nb p75 a été fusionné soit à la GST, soit à la TagRFP (TR) *via* un *linker* Gly_3-Ser-Gly_3 (3GS3G) ou Strep-Tag II (ST). La piste 4 (p75ST TR FT) est issue de le fraction non retenue de la colonne d'affinité StrepTrap (FT; *Flow Throught*). La flèche bleue correspond à la taille attendue des protéines de fusion. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa à droite du gel.

HisTrap suivie d'une étape de gel filtration. Comparés aux Nb-ST, les rendements de purification après chromatographie d'affinité sur IMAC des Nb-P semblent globalement supérieurs pour un même Nb. La figure 4.8 illustre un profil type de production de Cb. Les fractions 3 et 4 contiennent essentiellement une protéine dont la taille correspond au Cb (flèche bleue). Les fractions suivantes (de 6 à 9) contiennent une protéine majoritaire dont la taille pourrait correspondre à de la protéine porteuse seule qui pourrait être issue d'un clivage au niveau du *linker* (figure 4.8). Les protéines co-purifiées avec les Cb pouvant potentiellement interférer avec leur utilisation en ELISA, seules les fractions les plus pures en Cb ont été rassemblées et concentrées à 1 mg/ml par centrifugation sur membrane Centricon® (seuil d'exclusion de 20 kDa ; figure 4.8).

2. Comparaison des *linker* 3GS3G et StrepTagII

La taille des protéines contenues dans les fractions purifiées des Cb analysées, laissait à penser qu'un clivage pouvait avoir lieu au niveau du *linker,* situé entre le Nb et la protéine porteuse, car une bande pouvant correspondre à de la protéine porteuse seule était observée sur gel Tris-Tricine après électrophorèse et coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 4.8). Afin de se soustraire potentiellement à ce clivage et donc à la contamination des préparations des Nb-P, j'ai testé le *linker* StrepTagII (ST) en remplacement du *linker* 3GS3G en raison de sa compatibilité avec la purification par double chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap et StrepTrap. Quatre constructions ont été réalisées avec le Nb p75 en utilisant soit le *linker* 3GS3G soit le *linker* StrepTagII, permettant la liaison à la TagRFP (TR) ou à la GST. Ces différentes constructions ont été exprimées dans le cytoplasme des bactéries SHuffle. Après purification par simple ou double chromatographie (HisTrap uniquement ou HisTrap et StrepTrap), les différentes fractions contenant majoritairement la protéine d'intérêt ont été rassemblées et concentrées à 1 mg/ml, analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes et les protéines révélées par coloration au bleu de Coomassie (figure 4.9). La pureté des fractions collectées des Nb avec le *linker* ST n'est pas améliorée par rapport aux Nb présentant le *linker* 3GS3G. Des Nb fusionnés se retrouvent dans le *Flow Through* (FT) de la colonne, indiquant que les Nb ne sont pas tous retenus sur la colonne StrepTrap. Ceci peut s'expliquer par le fait que le StrepTagII, situé entre le Nb et la protéine porteuse, n'est peut être pas suffisamment accessible pour permettre aux Nb fusionnés de se fixer efficacement sur la

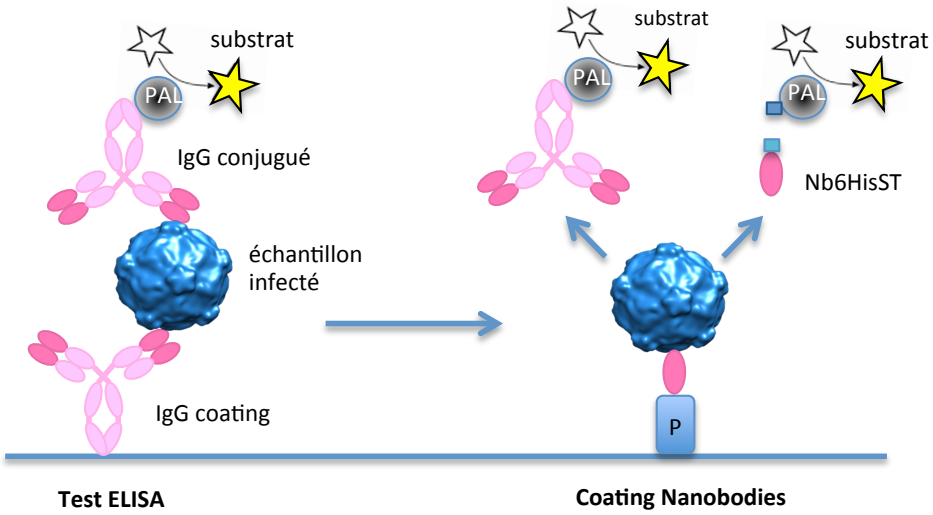


Figure 4.10. **Description de deux types d'ELISA hybride utilisant un coating Nb comparé à un DAS-ELISA classique.** Le coating direct des Nb n'étant pas fonctionnel, la fusion à une protéine carrier (notée P) a été réalisée. Lors d'un DAS-ELISA utilisant ce type de réactif, la présence de particules virales peut être révélée soit par les anticorps conjugués commerciaux, soit par les Nb.

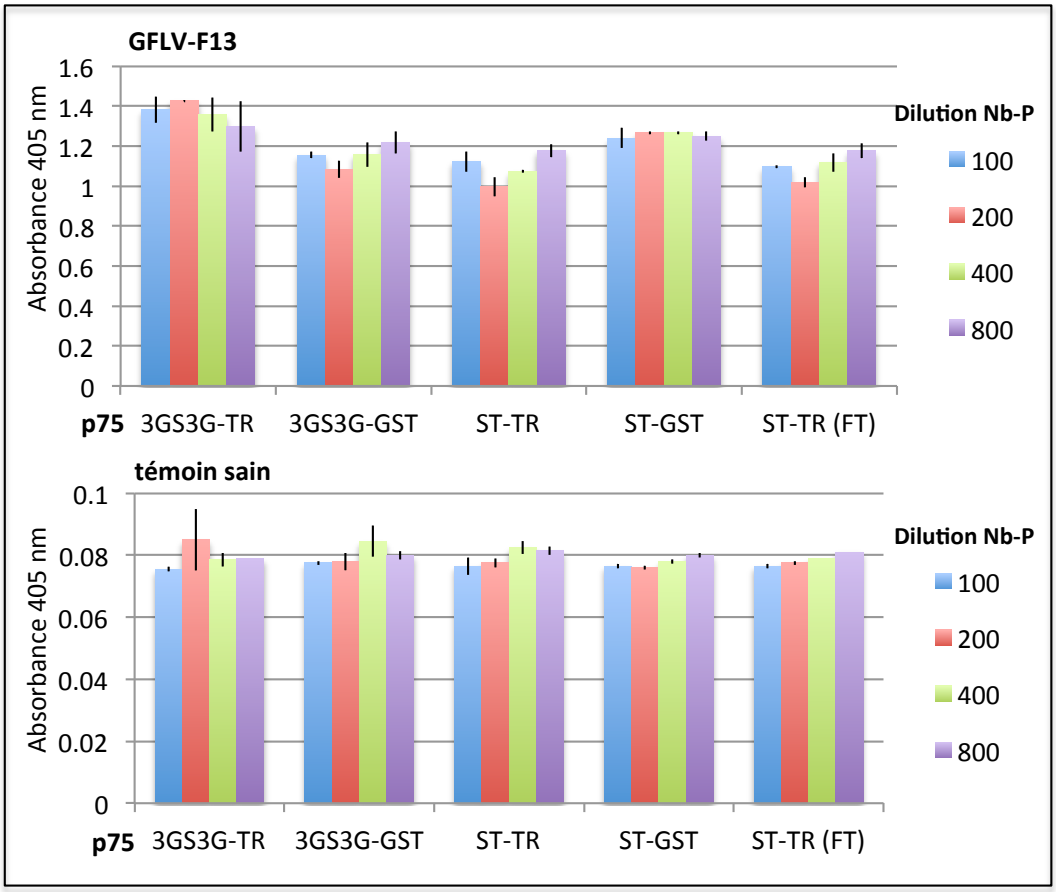


Figure 4.11. Test de fonctionnalité des fractions purifiées des Nb p75 fusionnés à la GST et la TagRFP (TR) pour la capture de particules virales de GFLV-F13 additionnée dans un broyat de feuilles de *N. benthamiana* sain. Le test est révélé par les anticorps conjugués commerciaux Bioreba anti-GFLV. (FT) = *Flow through*, correspond à l'échantillon non retenu ayant traversé la colonne d'affinité.

colonne d'affinité. Le rendement de production de ces Nb s'en trouve diminué, le rendement final du Nb-ST-TR et GST étant environ 3 fois plus faible que ceux des Nb-3GS3G-TR et GST.

3. Analyse de la fonctionnalité des Nb-P pour la capture des particules virales.

Les quatre Nb fusionnés produits (p75-3GS3G-TR ou GST et p75-ST-TR ou GST) ont été testés en DAS-ELISA selon la procédure hybride décrite figure 4.10. Dans ce cas, les DAS-ELISA ont été révélés grâce aux anticorps conjugués commerciaux (figure 4.11). En présence de virus, les valeurs d'absorbance mesurées pour les différentes fusions du Nb p75 sont sensiblement équivalentes entre les constructions 3GS3G-TR et 3GS3G-GST (statistiquement évalué par le test Anova suivi d'un test de Tukey, p-value=0,052) et entre les constructions ST-GST et 3GS3G-GST (p-value =1) alors que les absorbances de la construction 3GS3G-TR sont significativement plus élevées que celles de la construction ST-TR (p-value<0,001). Même l'échantillon provenant du FT de la colonne StrepTrap conduit à un signal positif en ELISA, confirmant que du Nb p75-ST-TR est bien perdu lors de la chromatographie d'affinité. Concernant les témoins sains, les valeurs d'absorbance mesurées sont équivalentes entre les différentes constructions (statistiquement évalué par le test Anova, p-value=0,586). La stratégie de construction comprenant le linker StrepTagII ne semble pas adéquate pour la purification des Nb ; elle ne confère ni amélioration de la pureté des Nb ni accroissement du signal en DAS-ELISA. En plus, elle conduit à un rendement plus faible que celui des constructions portant le linker 3GS3G. La stratégie du *linker* ST a donc été abandonnée. La fusion à la GST ne semble pas d'avantage intéressante, puisqu'aucune amélioration significative en termes de pureté ou d'intensité du signal par rapport aux Cb n'a été observée. Cette approche a donc également été abandonnée au profit de la production de Cb.

Outre leur utilisation en tant que réactif de coating en DAS-ELISA, les Cb présentent d'autres intérêts pour la détection du GFLV. Aurélie Marmonier (INRA de Colmar) a ainsi utilisé le Cb p59-TR en immuno-marquage pour la détection spécifique du GFLV dans le canal alimentaire du nématode. Ce marquage n'avait jamais pu être réalisé avec des anticorps conventionnels, probablement en raison de problèmes d'accessibilité des épitopes viraux et en raison d'un bruit de fond trop important généré par ces anticorps. Ces Cb permettent aussi le *biosensing* du GFLV-F13 *in planta,* développé à l'IBMP par Kamal Hleibieh afin

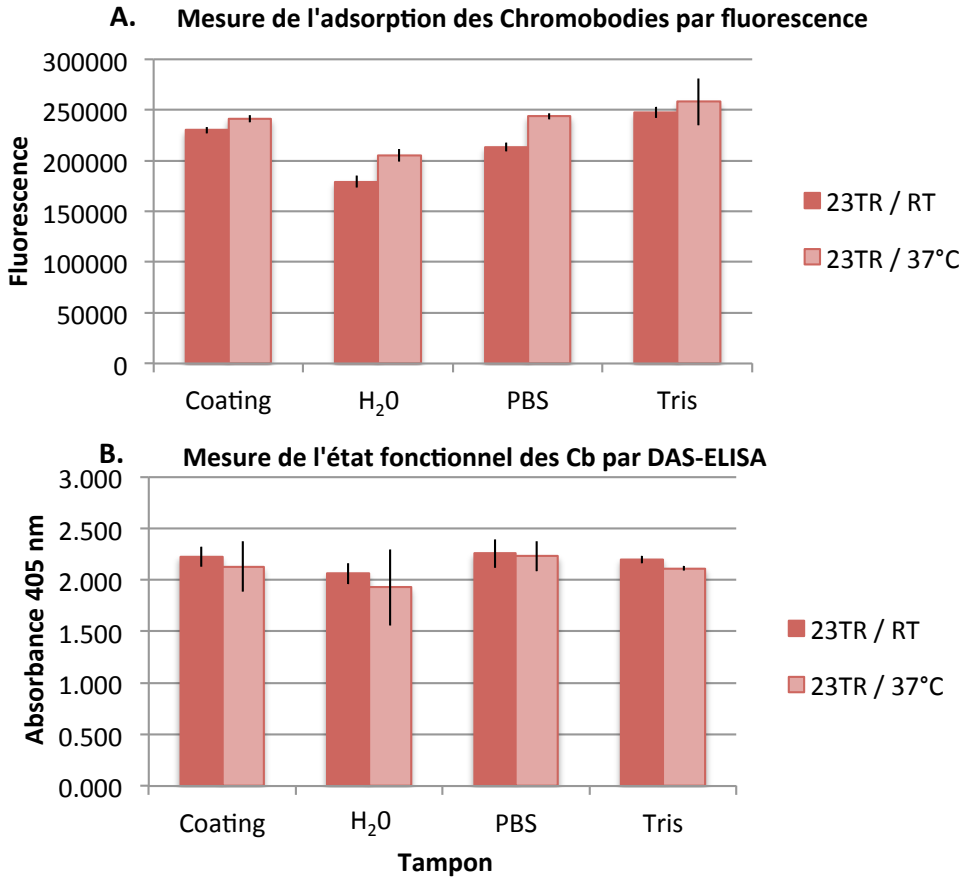


Figure 4.12. Effet du tampon et de la température d'incubation sur **(A)** l'adsorption et **(B)** la fonctionnalité des Chromobodies 23-TR (TR pour TagRFP) pour la capture des particules virales. En DAS-ELISA, les Cb dilués au 1:100 ont été testés contre un échantillon de *N. benthamiana* infecté par le GFLV-F13. La présence d'antigène est révélé par les anticorps commerciaux (Bioreba) conjugués à la phosphatase alcaline. RT = *room temperature;* température ambiante.

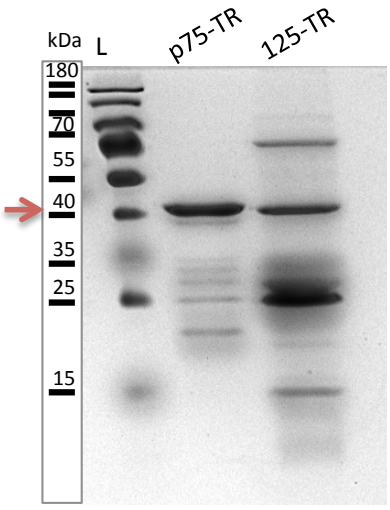


Figure 4.13. Analyse des fractions purifiées des Nb p75 et 125 fusionnés à la TagRFP (TR) obtenues par chromatographie d'affinité et gel filtration, après électrophorèse sur gel dénaturant et coloration des protéines au bleu de Coomassie. Ces deux Nb ont été utilisés pour former le DAS-ELISA Nb complet. Les bandes correspondant à la taille attendue des Cb sont indiquées par une flèche rouge. L = ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche du gel.

d'étudier les différentes étapes de l'infection virale. De plus, les Cb présentent l'avantage d'une coloration rose fuchsia sous la lumière blanche ce qui permet de ne pas les confondre avec le réactif de détection lors de la préparation d'un DAS-ELISA. Pour toutes ces raisons, et bien que non purifiés à homogénéité, les Nb-3GS3G-TR ont été utilisés comme réactif de coating pour les DAS-ELISA suivants. Ainsi, en plus du Nb p75-TR, j'ai produit les Nb 23-TR, 125-TR et p59-TR.

4. Optimisation des conditions d'utilisation des Cb

Dans un premier temps, j'ai cherché à optimiser les conditions d'utilisation des Cb comme réactif de coating, en évaluant l'effet de différents tampons (Coating, PBS, Tris-HCl) et de l'H_20, mais aussi de la température (température ambiante et 37°C) sur l'efficacité d'adsorption des Cb sur plaque ELISA en mesurant la fluorescence émise par les Cb après leur adsorption dans les puits d'une plaque ELISA. Les mesures de fluorescence ont été effectuées après trois heures d'incubation des Cb dans les différents tampons et à différentes températures, suivie de trois lavages de la plaque ELISA par un tampon phosphate salin (PBS 1X) additionné de Tween-20 0,05% (figure 4.12). Les mesures indiquent que les Cb s'adsorbent avec une meilleure efficacité à 37°C (statistiquement évalué par un test de Student, p-value = 0.027) et une efficacité globalement équivalente dans les tampons Tris-HCl pH 8, PBS pH 7.4 ou dans le tampon coating pH 9.6, l'eau semblant le milieu le moins approprié (statistiquement évalué par le test Anova suivi d'un test de Tukey, p-value=0,019 ; figure 4.12.A).

Dans un deuxième temps, j'ai cherché à savoir si l'efficacité de coating des Cb était corrélée à l'efficacité de capture du GFLV. Pour cela, les particules virales de GFLV diluées dans de l'extrait brut de *N. benthamiana* à 0.5 µg/ml ont été incubées dans les plaques ELISA et leur présence a été révélée par des anticorps anti-GFLV conjugués à la PAL (Bioreba). Les mesures d'absorbance montrent que le virus est capturé par les Cb avec la même efficacité quel que soit la température et le tampon utilisés, y compris l'eau (statistiquement évalué par le test Anova, p-value=0,133 ; figure 4.12.B) et avec une efficacité significativement plus importante à 37°C (statistiquement évalué par un test de Student, p-value = 0.007). Le tampon coating carbonate étant compatible avec la fonctionnalité de Cb et étant classiquement utilisé lors de l'étape de coating des anticorps conventionnels, c'est ce tampon que j'ai choisi pour l'ensemble des DAS-ELISA Nb suivants.

	Bioreba	INRA / IFV
Tampon coating	Carbonate pH 9.6 (50 mM)	Carbonate pH 9.6 (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$)
Tampon broyage vigne	200 mM Tris pH 8.2, **137 mM NaCl**, **2% PVP 24 kDa, 1% PEG 6kD**, 0.05% Tween 20	200 mM Tris pH 8.2, **140 mM NaCl**, **2% PVP 40 kDa**, 0.05% Tween 20
Tampon conjugué	20 mM **Tris** pH 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, **1 mM $MgCl_2$, 2 % PVP 24 kDa,** 0.05 % Tween 20, **0.2 % BSA**	**PBS** pH 7.4, 0,05% Tween 20, **0.1% BSA**
Tampon substrat	1 M diethanolamine pH 9.8	1 M diethanolamine pH 9.8
Tampon de lavage	PBS pH 7.4, 0.05 % Tween 20	PBS pH 7.4, 0.05 % Tween 20

Bioreba	**INRA / IFV (Méthode COFRAC)**
200 µL d'anticorps polyclonaux : **coating 4 heures à 30°C** dans le tampon coating	**100 µL** d'anticorps polyclonaux : coating **2 à 3 heures à 37°C** dans le tampon coating
3 lavages	3 lavages
Capture de l'antigène dans l'extrait brut de plante (broyage **1g dans 20ml**) et incubation à 4°C durant une nuit	Capture de l'antigène dans l'extrait brut de plante (broyage **1g dans 5ml**) et incubation à 4°C durant une nuit
4 lavages	4 lavages
Dépôt des anticorps conjugués à la PAL dilués dans le tampon conjugué et incubation **5h à 30°C**	Dépôt des anticorps conjugués à la PAL dilués dans le tampon conjugué et incubation **2h à 37°C**
3 lavages	3 lavages
Dépôt du substrat (PNPP 1mg/ml dilué dans le tampon substrat)	Dépôt du substrat (PNPP 1mg/ml dilué dans le tampon substrat)
Lecture à 1 et 2 heures	Lecture à 1 et 2 heures

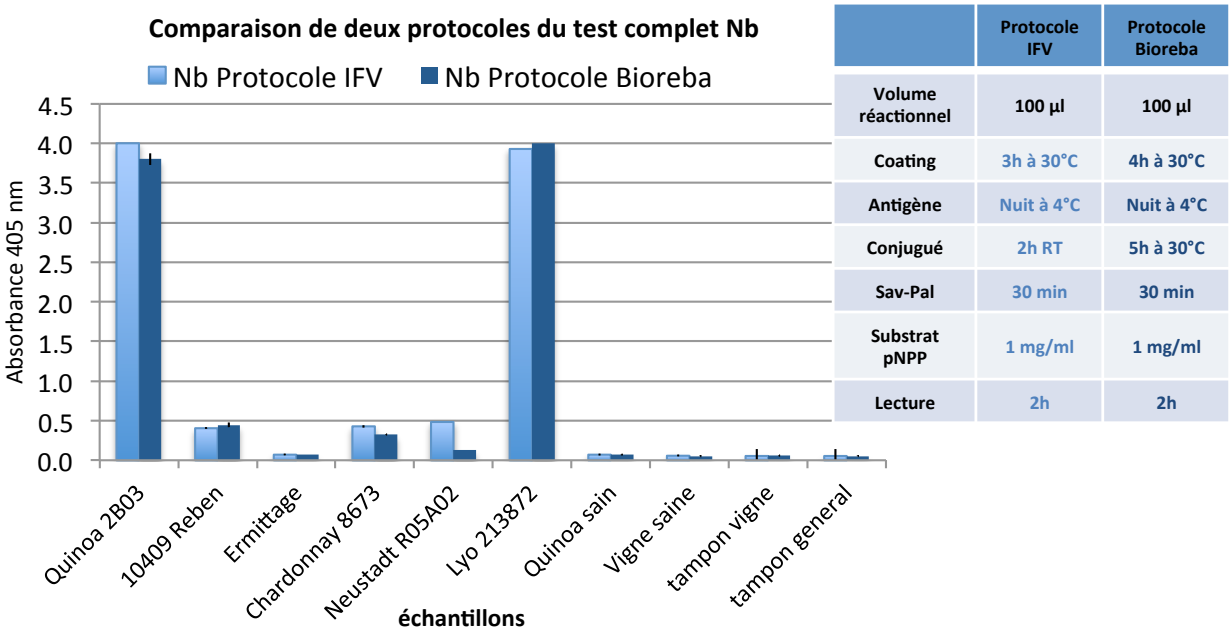
Figure 4.14. Comparaison de la composition des tampons et des protocoles DAS-ELISA développés par la société Bioreba et l'INRA de Colmar et utilisés à l'IFV. Les principales différences sont indiquées en rouge.

En plus du Nb p75-TR, j'ai choisi d'utiliser également le Nb 125 comme réactif de coating, parce que l'association des ces Nb permet de couvrir l'ensemble du spectre d'isolats de GFLV à notre disposition, comme le test anti-GFLV commercial (paragraphe I.B.). La pureté de ces deux Nb a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (figure 4.13) avant leur utilisation comme réactifs de coating dans les DAS-ELISA suivant. La conclusion la plus importante de cette partie de mon travail de thèse est la validation fonctionnelles des Cb en lieu et place des anticorps de coating, ce qui semble original d'après mon analyse de la littérature relative aux Nb ou aux autres protéines de type anticorps tels que les scFv.

III. Évaluation du test complet Nb

Ayant validé l'utilisation de Nb pour la capture (*via* les Cb, paragraphe II) et la détection d'un large spectre d'isolats de GFLV en vigne ou sur hôte herbacés (*via* les Nb-6HisST, paragraphe I), j'ai cherché à savoir si je pouvais i) associer les réactifs de coating et de détection Nb produits lors d'un DAS-ELISA ii) faire fonctionner ces réactifs en suivant des protocoles utilisés en routine, et iii) vérifier la performance du test complet Nb par rapport au kit commercial anti-GFLV Bioreba.

La composition des tampons et le protocole utilisés par l'entreprise Bioreba diffèrent légèrement de ceux utilisés à l'IFV. Les tests réalisés à l'IFV se basent en fait sur un protocole et des tampons précédemment développés à l'INRA de Colmar et respectant la Méthode Officielle (vv./04/05.b). Ces différences sont indiquées en rouge figure 4.14. Le test Nb a d'abord été réalisé selon les deux protocoles (INRA/IFV et Bioreba) afin d'évaluer leur incidence sur la réactivité du test complet contre des échantillons de référence de l'entreprise Bioreba. À quantité de Nb déposé identique (100 µl), la différence de temps d'incubation et de température ne semble pas avoir d'effet sur le signal du test Nb que ce soit pour les échantillons infectés ou les témoins sains (figure 4.15). Néanmoins, à performance égale, le protocole INRA/IFV permet de réduire de 4 heures la durée d'obtention des résultats par rapport au protocole Bioreba. La plus grande différence entre ces deux protocoles se situe au niveau du temps d'incubation du réactif de détection, qui passe de 5 heures pour le protocole Bioreba, à 2 heures pour le protocole INRA/IFV. Ceci confère un avantage pour la rapidité d'obtention du résultat du test de diagnostic mais permet aussi la gestion d'un plus grand nombre d'échantillons répartis sur deux demi-journées.



	Protocole IFV	Protocole Bioreba
Volume réactionnel	100 µl	100 µl
Coating	3h à 30°C	4h à 30°C
Antigène	Nuit à 4°C	Nuit à 4°C
Conjugué	2h RT	5h à 30°C
Sav-Pal	30 min	30 min
Substrat pNPP	1 mg/ml	1 mg/ml
Lecture	2h	2h

Figure 4.15. Comparaison de la performance des réactifs Nb selon le protocole réalisé à l'IFV ou préconisé par l'entreprise Bioreba. Les Cb 125-TR et p75-TR dilués au 1:400 ont été utilisés comme réactif de coating et les Nb 23-6HisST et p59-6HisST dilués au 1:100 comme réactif de détection.

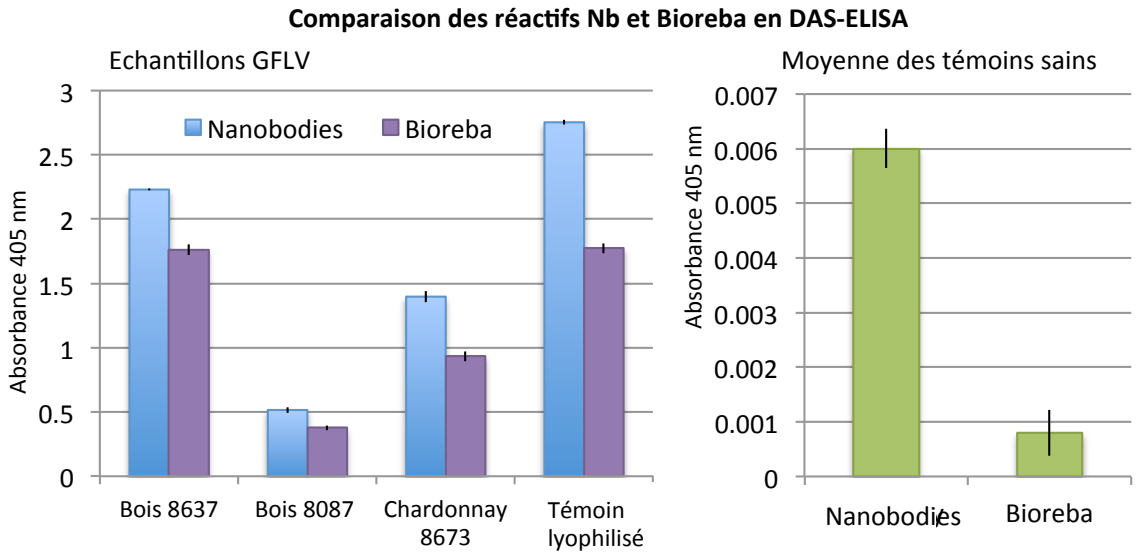


Figure 4.16. Comparaison des réactifs Nb et Bioreba en DAS-ELISA pour la détection du GFLV. Cette analyse a été réalisée chez l'entreprise Bioreba contre trois échantillons vigne de référence infectés par le GFLV. Une quantité identique d'anticorps a été déposée dans les puits de la plaque ELISA pour les deux types de réactif. L'expérience a été réalisée selon le protocole INRA/IFV pour les réactifs Nb et selon le protocole commercial pour les réactifs Bioreba. La capture des particules virales est réalisée grâce aux Cb 125-TR et p75-TR dilués au 1:400 et leur présence est révélée par les Nb p75-6HisST et p59-6HisST dilués au 1:100. Afin d'avoir une représentation plus visible des résultats, les valeurs d'absorbance des échantillons virosés et la moyenne des témoins sains sont présentés séparément dans les graphiques du haut et du bas respectivement.

Par la suite, j'ai comparé l'efficacité du test complet Nb par rapport au kit commercial Bioreba. Pour pouvoir comparer les tests Bioreba et Nb, le DAS-ELISA a été réalisé en suivant le protocole Bioreba pour le kit de détection commercial et le protocole INRA/IFV pour le test Nb, en n'utilisant que 100 µL de réactif pour les deux tests (figure 4.16). Toutes les valeurs d'absorbance sont supérieures pour le DAS-ELISA Nb par rapport au test Bioreba. La valeur d'absorbance des témoins sain est relativement faible pour le test Nb et acceptable pour le développement d'un DAS-ELISA (figure 4.16). Cependant, elle reste plus élevée que celle du test Bioreba (DO TS=0.0605 pour le test Nb contre 0.0107 pour le test Bioreba). Cette valeur d'absorbance plus élevée pour le témoin sain peut désavantager le diagnostic d'échantillons faiblement infectés pour lesquels la valeur d'absorbance est faible. Ayant validé la fonctionnalité d'un test complet composé uniquement de Nb, j'ai poursuivi mes investigations en optimisant le réactif de détection, afin d'améliorer le rapport signal/bruit du test Nb, mais également afin de réduire le nombre d'étapes du test Nb.

IV. Optimisation de l'étape de détection et de révélation du test Nb

Forte de la fonctionnalité du test Nb complet, j'ai cherché à optimiser l'étape de détection du test Nb. En effet, la majorité des kits commerciaux ELISA comporte une seule étape de détection à l'aide d'anticorps conjugués à une enzyme. Afin de s'aligner sur le nombre d'étapes des DAS-ELISA conventionnels, j'ai cherché à réduire le nombre d'étapes de détection du test Nb selon différentes stratégies et à optimiser l'utilisation de ces nouveaux réactifs.

1. Réduction du nombre d'étapes de détection du test Nb

A. Couplage chimique des Nb à la PAL

Dans la majorité des kits de détection de type DAS-ELISA, l'étape de détection est effectuée grâce à des anticorps directement couplés à une enzyme, généralement la phosphatase alcaline. Il existe une multitude d'agents de couplage, le plus connu étant le glutaraldéhyde, un dialdéhyde qui agit au niveau des groupements amines des protéines. Afin de se rapprocher des conditions des tests commerciaux existants et de s'aligner sur le nombre d'étape du DAS-ELISA commercial, les Nb p59-6HisST et Cb p59-TR purifiés (figure

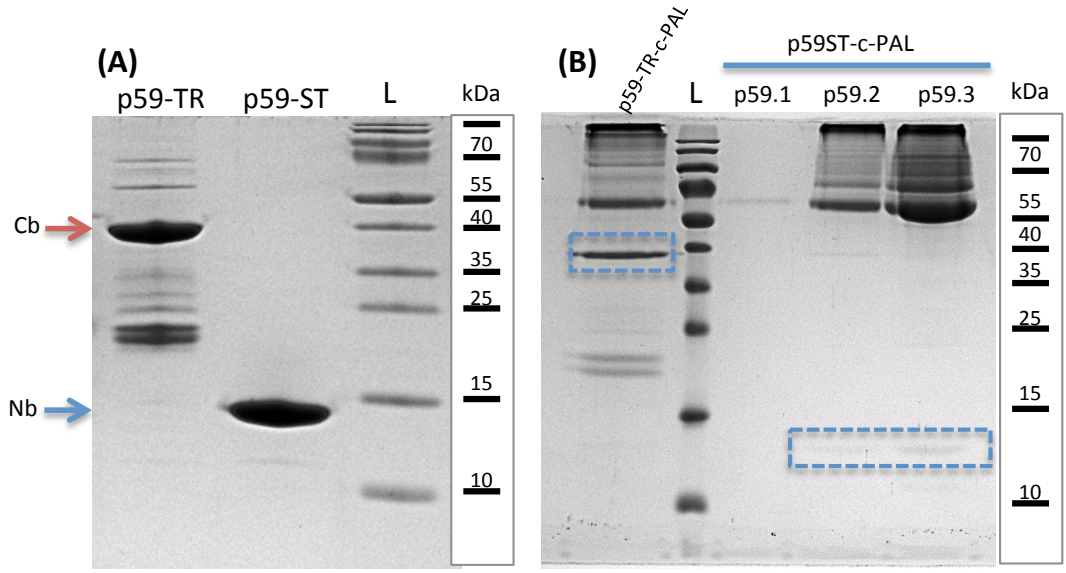


Figure 4.17. Analyse des fractions d'élution concentrées après gel filtration, par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes après coloration des protéines au bleu de Coomassie **(A)** avant le couplage puis **(B)** après le couplage chimique de la phosphatase alcaline aux Cb p59-TR et aux Nb p59-ST. Les bandes correspondant à la taille attendue des Cb et de Nb sont indiquées par une flèche, respectivement en rouge et en bleu. Les fractions d'un pic d'élution unique ont été concentrées pour le Cb p59-TR couplé à la PAL TR (p59-TR-c-PAL). Trois pics d'élution distincts ont été observés après purification du Nb p59 couplés à la PAL (p59ST-c-PAL) et les fractions d'élution correspondantes ont été concentrées séparément. Les encadrés bleus soulignent la proportion de Cb p59-TR et de Nb p59-ST non couplé à la PAl. L = ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa entre les deux gels.

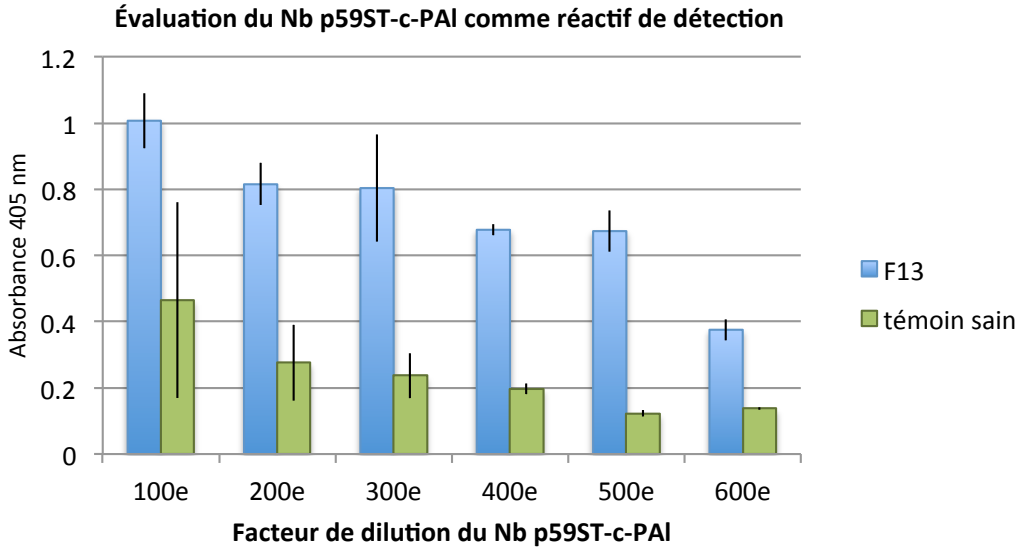


Figure 4.18. DAS-ELISA contre un échantillon de vigne infectée par le GFLV, révélé par les Nb p59-ST couplés à la phosphatase alcaline (p59ST-c-PAL) à différentes dilutions dans le tampon conjugué. Les Cb p59-TR dilués au 1:400 ont été utilisés comme réactif de coating contre 50 ng de GFLV-F13 purifié, dilué dans un extrait brut de vigne saine. La présence des particules virales a été révélée par des dilutions du Nb p59 couplé à la PAl.

4.17.A) ont été couplés chimiquement à la phosphatase alcaline. Ces compétences n'étant pas disponibles dans les équipes de recherche de Strasbourg et de Colmar, j'ai participé à cette opération chez l'entreprise Bioreba selon un procédé confidentiel, utilisé pour le couplage de la PAL aux anticorps monoclonaux ou polyclonaux commercialisés par cette société. À l'issue du couplage, une étape de gel filtration sur une colonne Sephacryl S-300 a également été effectuée chez l'entreprise Bioreba. Mon travail a ensuite consisté à analyser les échantillons sur gel de protéine dénaturant. Un seul pic d'élution a été observé pour le couplage du Cb p59-TR (Cb p59-TR-c-PAL) et trois pour le couplage du Nb p59-ST (Nb p59ST-c-PAL) à la suite de la filtration sur la colonne Sephacryl S-300 (résultats non montrés). Les fractions d'élution de chaque pic ont été concentrées et analysées par électrophorèse sur gel Tris-Tricine, puis les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie (figure 4.17.B). La fraction d'élution du Cb p59-TR-c-PAL contient une proportion importante de Cb non couplés à la PAL (encadrée en bleu figure 4.17.B). Ceci pose problème car ces Cb non couplés entrent en compétition avec les Cb couplés lors de leur utilisation comme réactif de détection, diminuant le signal du DAS-ELISA. Ces Cb n'ont donc pas été testés en DAS-ELISA. Le pic d'élution 1 du Nbp59ST-c-PAL semblait ne contenir qu'une faible proportion de Nb-c-PAL contrairement aux pics 2 et 3 enrichis en Nb-PAL, mais dans lesquels une très faible proportion de Nb libre était tout de même détectée (encadrée en bleu figure 4.17.B).

La fonctionnalité des Nb p59ST-c-PAL de la fraction 2 a ensuite été évaluée en DAS-ELISA en utilisant le Cb p59-TR comme réactif de coating, contre 50 ng de virus purifié dilué dans de l'extrait brut de feuilles de vigne saine (figure 4.18). Les absorbances mesurées pour les échantillons sains étaient tellement élevées (de 0.138 à 0.465, figure 4.18), qu'il était impossible d'envisager d'utiliser ces réactifs pour de la détection en DAS-ELISA. Ces absorbances élevées s'expliquent certainement par la présence de PAL non couplée dans les fractions testées. En effet, la colonne de gel filtration Sephacryl S-300 ayant servie à la purification des Nb et Cb après leur couplage à la phosphatase alcaline, est habituellement utilisée par Bioreba pour la purification d'anticorps conjugués. La taille des anticorps conventionnels étant d'environ 150 kDa et celle de la PAL monomérique de 58 kDa, la différence de taille entre les Ac-PAL, la PAL non couplée et les Ac non couplés permet une migration différentielle et donc une purification distincte de ces trois populations de protéines par gel filtration. Les Nb n'ayant qu'un poids moléculaire de 15 kDa, la colonne S-300 n'est pas suffisamment résolutive pour différencier la PAL non couplée de la PAL couplée aux Nb. Les trois populations de protéines (Nb seuls, PAL seules et complexe NbST-

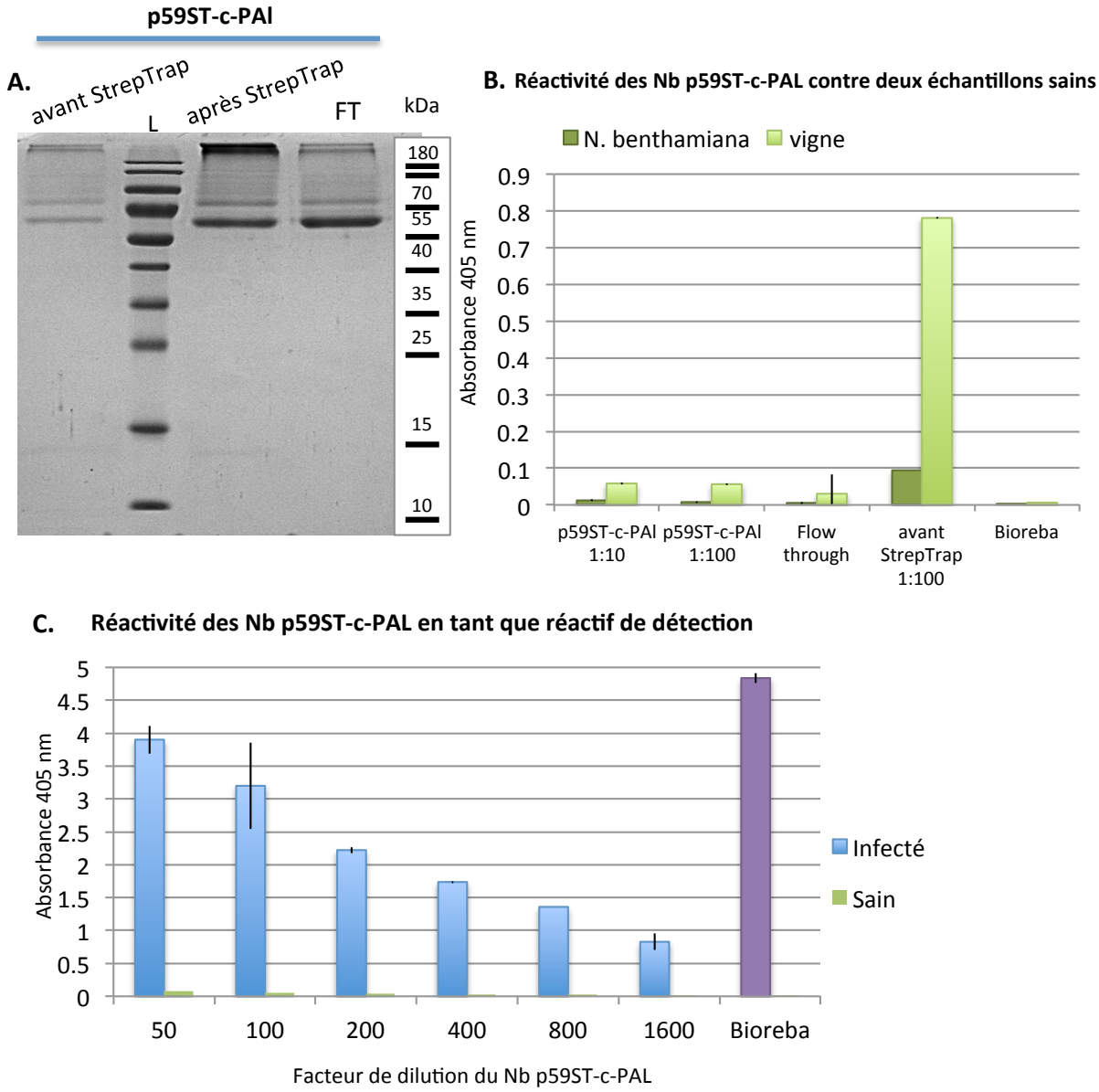


Figure 4.19. **(A) Analyse des fractions du Nb p59ST-c-PAL purifiées**, collectées avant et après colonne StrepTrap, par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine et coloration au bleu de Coomassie. FT = *Flow through*, correspond à l'échantillon non retenu ayant traversé la colonne d'affinité. L = *ladder*; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à droite du gel. Les fractions purifiées ont été testées à différentes dilutions contre **(B)** de l'extrait de feuilles de vigne et de *N. benthamiana* sain puis **(C)** contre un échantillon de vigne infectée par le GFLV-F13. La capture des particules virales a été réalisée par les anticorps de coating commerciaux Bioreba.

c-PAL) sont donc probablement éluées dans les mêmes fractions lors de la gel filtration. La phosphatase alcaline, pouvant être purifiée par IMAC grâce à un Tag polyhistidine (Yamabhai, 2008), j'ai donc choisi de purifier les Nb p59ST-c-PAL par chromatographie d'affinité sur colonne StrepTrap.

Afin d'éliminer la PAL non couplée, les fractions 1, 2 et 3 ont été regroupées et l'échantillon total a été injecté sur colonne StrepTrap pour permettre la purification du complexe par chromatographie d'affinité, *via* le StrepTagII présent en C-terminal des Nb-6HisST (figure 4.19.A). L'analyse par électrophorèse sur gel Tris-Tricine dénaturant n'ayant révélé aucune différence notable de composition avant et après chromatographie d'affinité, ni même avec l'échantillon issu du *Flow Through* (FT) de la colonne (figure 4.19.A), les Nb p59ST-c-PAL avant et après purification ont été testés directement en tant que réactifs de détection en DAS-ELISA à raison de dilutions au 1 :10 et au 1 :100 contre deux échantillons sains (*N. benthamiana* et vigne). Ceci a permis de montrer l'efficacité de la chromatographie d'affinité StrepTrap puisque qu'après purification, les Nb-c-PAL ne réagissent plus que très faiblement contre l'extrait de vigne saine, comparé aux Nb p59ST-c-PAl avant StrepTrap (figure 4.19.B). Des dilutions de Nb p59-c-PAl ainsi purifiés ont donc été testées contre un échantillon de vigne infectée par le GFLV-F13. Bien que permettant la détection du GFLV dans ces échantillons, aucune dilution de Nb p59-c-Pal n'a permis de générer un signal supérieur à celui du test Bioreba (signal maximal de 3.90 pour le test Nb contre 4.84 pour le test Bioreba). De plus, le bruit de fond provenant des Nb p59-c-Pal sur les échantillons sains s'est avéré 10 fois supérieur à celui mesurée avec le test Bioreba (DO TS=0.081 contre DO TS=0.008) (figure 4.19.C).

Le couplage des Nb à la phosphatase alcaline comporte plusieurs inconvénients. Le premier est que cette stratégie ne permet d'obtenir que de faibles rendements de Nb effectivement couplés. À partir de 5 mg de Nb p59ST fournis à l'entreprise Bioreba, seul 0.8 mg ont été récupérés après purification par StrepTrap. De plus, il est difficile de quantifier le complexe Nb-c-PAL en raison de l'efficacité de couplage variable, rendant la comparaison quantitative entre différents Nb couplés difficile à établir en DAS-ELISA. Un autre inconvénient est que le couplage chimique nécessite l'achat de phosphatase alcaline et de réactifs de couplage spécifiques et onéreux ainsi que la mobilisation sur deux jours d'un personnel qualifié de laboratoire pour réaliser le couplage et la purification du complexe. Enfin, comme j'ai pu le montrer, le Nb p59ST couplé à la PAL utilisé comme réactif de détection ne permet pas de concurrencer le test commercial existant. Compte-tenu de

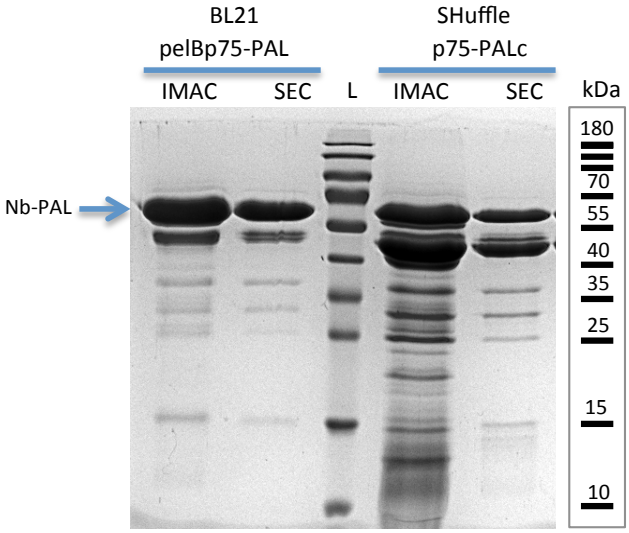


Figure 4.20. Analyse des protéines des fractions purifiées et concentrées à 0,5 mg/ml du Nb p75 fusionné à la phosphatase alcaline, obtenues par expression périplasmique en bactéries BL21 ou cytoplasmique en bactéries SHuffle, après électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant et coloration et coloration au bleu de Coomassie. La flèche bleue correspond à la taille attendue du Nb p75-PAL. L = ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à droite du gel.

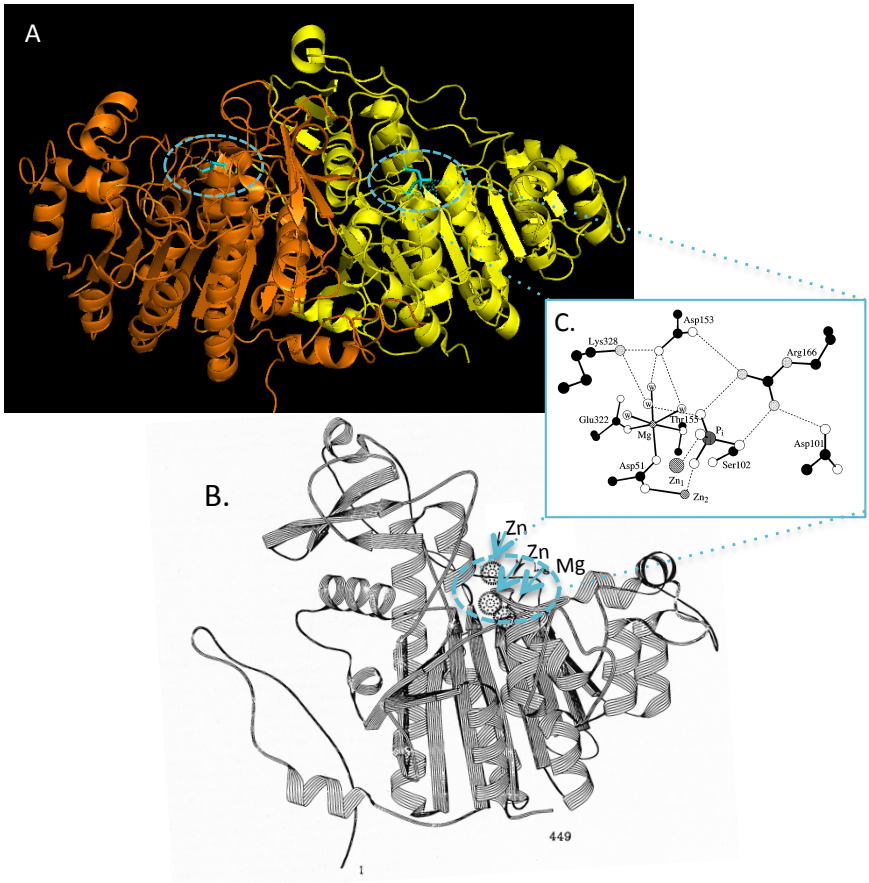


Figure 4.21. (A) et (B) Représentation en ruban de la structure de la phosphatase alcaline d'*E.coli* sous forme de dimère et de monomère avec **(C)** un agrandissement du site actif de l'enzyme, montrant l'implication de deux ions zinc et un ion magnésium. D'après Holtz et Kantrowitz (1999) et Kim et Wyckoff (1990) à l'aide du fichier pdb 1ALK (Kim et Wyckoff, 1993). Les cercles en pointillés bleus indiquent la localisation du site actif de l'enzyme.

l'ensemble de ces éléments, cette stratégie de production a été abandonnée au profit de la production de Nb directement fusionnés à la phosphatase alcaline en bactéries *E. coli*.

B. Fusion génétique des Nb à la phosphatase alcaline

a. Clonage et production des Nb-PAL

La phosphatase alcaline bactérienne est une enzyme naturellement présente dans le périplasme de nombreuse bactéries y compris *E. coli* (McComb *et al.,* 1979). La fusion de Nb à la PAL bactérienne a été décrite par Swain *et al.,* (2011) pour la détection de trois toxines (la ricine, la toxine du choléra et l'entérotoxine staphylococcique B) et par Liu *et al.* (2015) pour la détection en ELISA de l'ochratoxine A. Dans ce cas, la production de protéines de fusion est périplasmique et s'effectue à partir de bactéries BL21(DE3). Cette stratégie permet l'obtention de protéines de fusion structurées et fonctionnelles en ELISA (Liu *et al.,* 2015). Par ailleurs, un double mutant D330N/D153G de la PAL d'*E. coli* présentant des avantages en termes d'activité enzymatique, de stabilité et de compatibilité avec un système d'expression procaryote a été développé par Muller *et al.,* (2001). Ce mutant de PAL bactérienne montre une activité quarante fois supérieure à l'enzyme sauvage et équivalente à celle de la PAL bovine. Le vecteur portant la séquence de cette PAL doublement mutée nous a été fourni et a servi de matrice pour l'amplification et le clonage de cette PAL mutée dans le vecteur d'expression bactérienne pet22 par clonage classique. Cette construction, dénommée pelBNb-PAL, permet l'expression d'une protéine possédant de N en C-terminal respectivement, le peptide signal pelB, le Nb d'intérêt, le linker 3GS3G, la PAL doublement mutée et l'étiquette 6His. En parallèle, j'ai produit les Nb-PAL dans le cytoplasme des bactéries SHuffle, cette méthode étant utilisée par Tu *et al.,* (2015) pour permettre la production cytoplasmique de Nb-PAL par *click chemistry*. Dans ce cas, la construction est dénommée Nb-PALc, car elle permet l'expression d'une protéine possédant de N en C-terminal respectivement, le Nb d'intérêt, le linker 3GS3G, la PAL doublement mutée et l'étiquette 6His. Compte-tenu des résultats initiaux montrant que le Nb p75 possède un bon rendement de production en *E. coli*, un large spectre de détection et une bonne efficacité de reconnaissance du GFLV (voir paragraphe I), mon choix s'est porté sur le Nb p75 pour tester l'efficacité de la protéine de fusion Nb-PAL comme outil de détection. Les protéines pelBNbp75-PAL et Nbp75-PALc purifiées ont été produites respectivement dans les bactéries *E. coli* BL21 et SHuffle puis analysées sur gel par électrophorèse de polyacrylamide

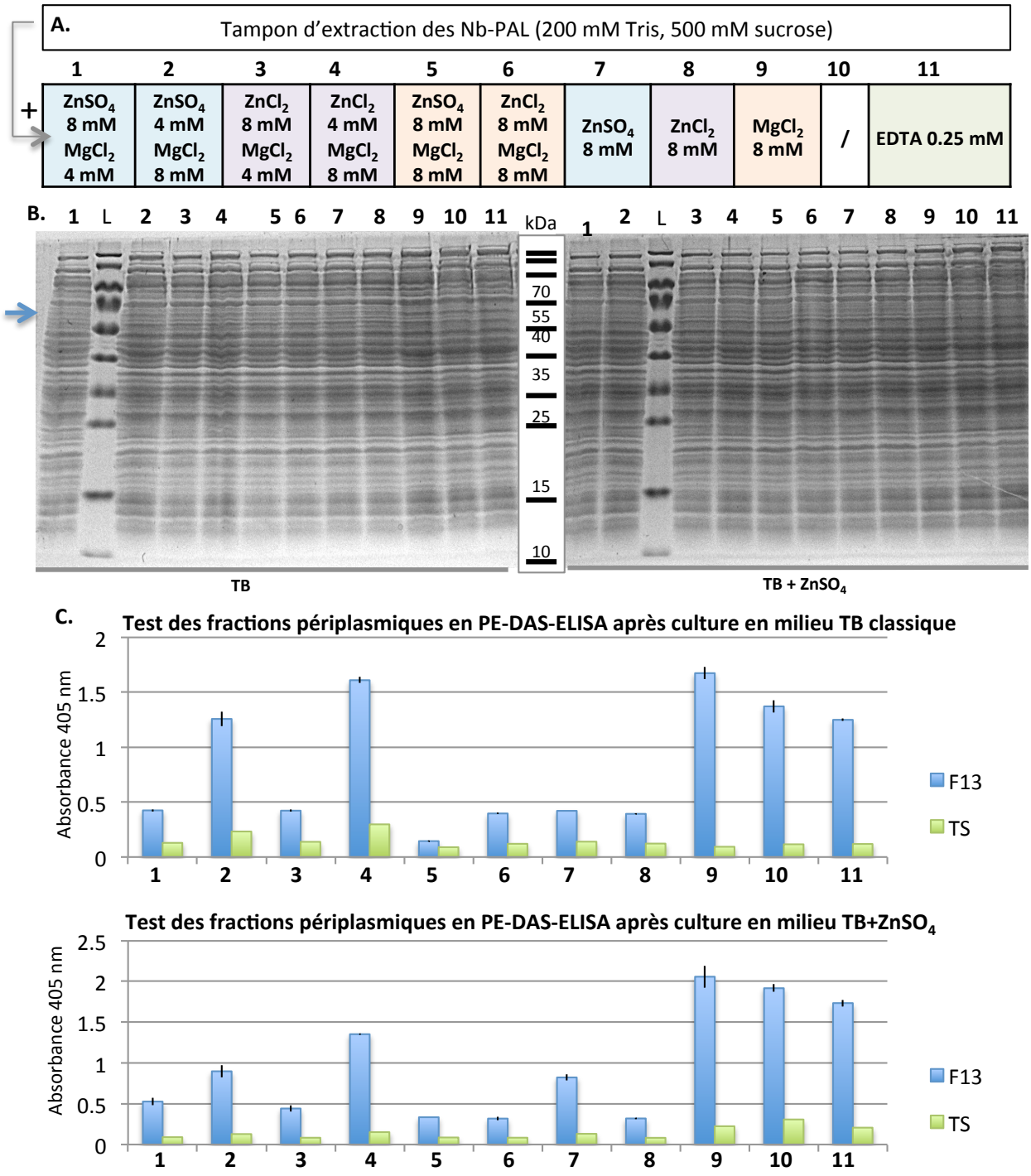


Figure 4.22. Analyse de l'effet de zinc, de magnésium ou d'EDTA seuls ou en combinaison sur la production du Nb p75-PAL (A) Composition des différents tampons d'extraction périplasmique (numérotés de 1 à 11) testés à partir du milieu d'extraction de base (200 mM Tris pH8 ; 500 mM sucrose), **(B)** Analyse des protéines extraites du périplasme des bactéries BL21 produisant le Nb p75-PAL dans les différents tampons, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et coloration des protéines au bleu de Coomassie. Les bactéries ont été cultivées dans un milieu de culture TB seul (gauche) ou supplémenté avec 0.1 mM de $ZnSO_4$ (droite). La flèche bleue correspond à la taille attendue du Nb p75-PAL. L = ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa entre les deux gels. **(C)** PE-DAS-ELISA réalisé à partir des fractions périplasmiques extraites dans les différents tampons comme réactif de détection. La capture des particules virales contenu dans un échantillon de vigne infectée est réalisée avec des anticorps polyclonaux commerciaux.

dénaturant après IMAC et gel filtration (figure 4.20). L'analyse du gel après coloration des protéines au bleu de Coomassie montre que la purification des protéines de fusion périplasmiques est de meilleure qualité car le pelBNbp75-PAL est essentiellement présent sous forme de protéine de fusion complète avec peu de protéines co-purifiées contrairement à ce qui est observé pour la purification du Nbp75-PALc. C'est donc selon le système de production périplasmique des Nb-PAL que j'ai continué mes investigations.

b. Optimisation de la production des Nb-PAL

La PAL est une métallo-enzyme active sous forme de dimère, dont le site actif contient deux ions Zn^{2+} et un ion Mg^{2+} (figure 4.21 ; McComb *et al.,* 1979). L'activité de cette enzyme est optimale à pH alcalin et est inhibée par les ions phosphates ainsi que par l'EDTA, chélateur d'ions divalents (Fernley et Walker, 1967 ; McComb *et al.,* 1979). L'ajout de zinc ou de magnésium dans les milieux de culture des bactéries ou dans les tampons d'extraction des protéines peut favoriser la stabilité et préserver l'activité de l'enzyme (McComb *et al.,* 1979). L'activité enzymatique du double mutant D330N/D153G n'ayant été que peu caractérisée, j'ai testé différentes conditions d'extraction et de purification par affinité. Ainsi, le milieu de culture bactérien a été complémenté ou non par du zinc, et le tampon d'extraction des protéines (200 mM de Tris pH8, 500 mM de sucrose) a été additionné avec différents ratio de magnésium et de zinc, d'après les concentrations suggérées par Olorunniji *et al.* (2007) (figure 4.22.A). Après extraction, les différentes fractions ont été déposées sur gels dénaturants afin d'évaluer la quantité de Nb-PAL produite (figure 4.22.B). Que la production ait été réalisée dans un milieu supplémenté ou non en zinc, les fractions 9, 10 et 11 semblent comporter une quantité de protéines légèrement supérieure aux autres fractions.

Afin d'évaluer l'activité enzymatique des protéines de fusion ainsi produites, ces protéines ont été testées par *Periplasmic Extract* DAS-ELISA (PE-DAS-ELISA) qui consiste à utiliser les différentes fractions d'extraction non diluées comme réactif de détection, contre un échantillon de vigne infecté ou sain (figure 4.22.C). Les absorbances mesurées montrent que les Nb-PAL sont bien fonctionnels et permettent la détection de la souche de référence, le GFLV-F13. En accord avec l'efficacité de production de Nb-PAL observée précédemment (figure 4.22.A), ce sont les fractions 9, 10 et 11 (en absence de zinc) qui présentent la meilleure activité enzymatique, et inversement, celles contenant du zinc à forte dose (8 mM)

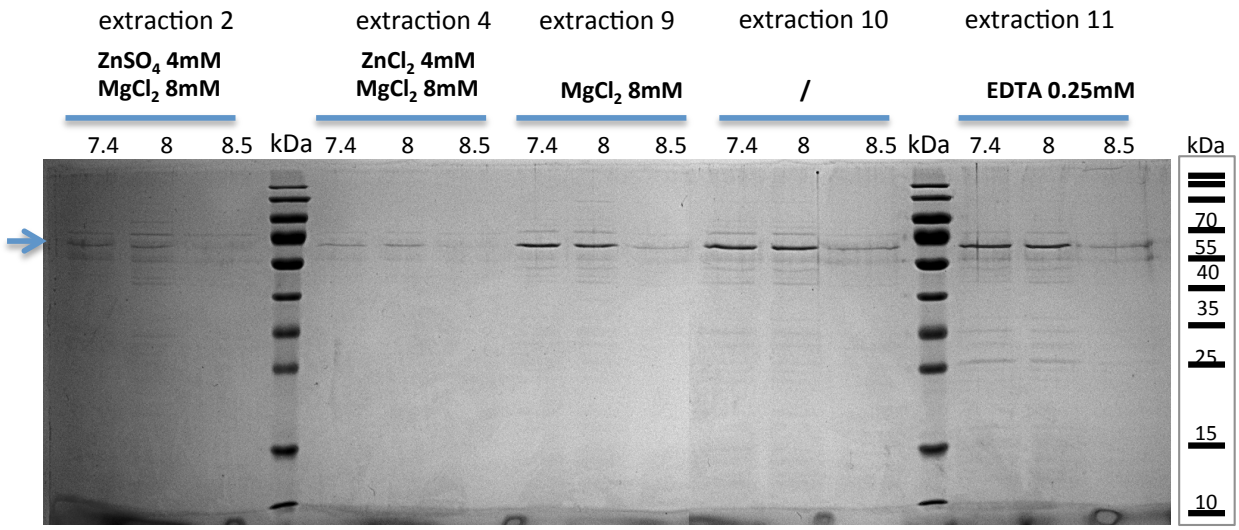


Figure 4.23. Analyse des extraits protéiques bactériens périplasmiques purifiés par affinité sur billes de sépharose HisTrap, à partir de tampon IMAC à différents pH (7.4, 8 et 8.5), après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie. La flèche bleue correspond à la taille attendue du Nb p75-PAL. L = ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à droite des gels.

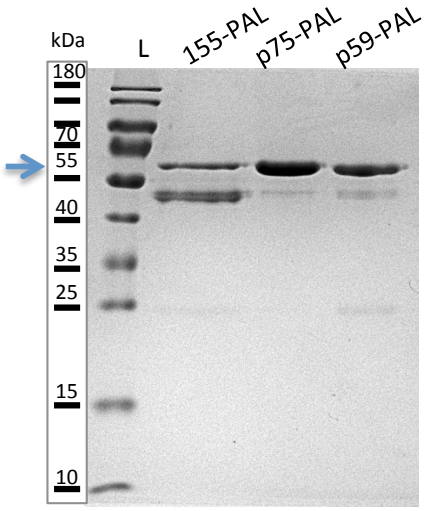


Figure 4.24. Analyse des fractions purifiées des Nb p75, 125 et 155 fusionnés à la phosphatase alcaline (PAL) obtenues par chromatographie d'affinité et gel filtration, après électrophorèse sur gel d'acrylamide et coloration des protéines au bleu de Coomassie. Ces trois Nb sont ceux utilisés pour former le DAS-ELISA Nb complet. Les bandes correspondant à la taille attendue des Nb-PAL sont indiquées par une flèche bleue. L = ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche du gel.

qui sont les moins efficaces en détection. La présence de zinc dans le tampon d'extraction semble donc avoir un impact négatif sur la phosphatase alcaline, notamment à forte concentration.

Le pH et la présence d'ions divalents comme l'EDTA étant des facteurs pouvant influencer la purification de protéines par IMAC (Bailon, 2000), j'ai ensuite cherché à déterminer les conditions les plus adaptées à la purification du Nb p75-PAL. L'analyse par électrophorèse sur gel dénaturant montre que les meilleurs rendements de purification sont observés à pH 7,4 en absence de zinc (figure 4.23). Il est probable que le zinc en forte concentration puisse se fixer sur l'étiquette 6His et ainsi entrer en compétition avec le nickel présent sur les billes de la colonne lors de l'IMAC. Les conditions de production et de purification des Nb-PAl ont donc été clairement définies comme devant être réalisées en absence de zinc et à pH inférieur à 8.5.

La stratégie de clonage, de production et de purification étant établie sur la base des études ci-dessus sur le Nb p75, j'ai produit et purifié de la même manière les Nb p59 et 155 sous forme fusionnée à la PAL mutée. Ces Nb ont été choisis suite au criblage réalisé sur les collections de vignes infectées par le GFLV (paragraphe I.1.B.), car leur association permet de couvrir l'ensemble du spectre d'isolats de GFLV à notre disposition reconnus par le test anti-GFLV commercial. Les Nb de la famille 3 (125 et 159) n'ont pas été produits car comparés au Nb 155, ces Nb montrent des rendements de purification extrêmement faibles après expression périplasmique, et sont de ce fait incompatibles avec le développement d'un test commercial. De même, le Nb23-PAL a finalement lui aussi été écarté de la composition du test final au profit du Nb p75-PAL, en raison de son plus faible rendement (7.2 mg/L pour le Nb p75-PAL contre 2.7 mg/L pour le Nb 23-PAL), ce qui avait d'ailleurs déjà été observé pour les Nb-6HisST (tableau 4.2). L'ensemble des Nb-PAL sélectionnés dans la perspective d'élaboration du test complet Nb a été vérifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant après coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 4.24). Contrairement au p75-PAL et au p59-PAL, le Nb155-PAL présente une protéine additionnelle d'environ 45 kDa de nature inconnue. Ces trois Nb ont toutefois été utilisés seuls ou en combinaisons lors des tests DAS-ELISA suivants.

A. conditions testées

$MgCl_2$ 8 mM	$MgCl_2$ 8 mM $ZnSO_4$ 0.1 mM PVP 2%	MgCl2 8 mM $ZnSO_4$ 0.1mM	$MgCl_2$ 8 mM PVP 2%	$MgCl_2$ 4 mM	$MgCl_2$ 4 mM $ZnSO_4$ 0.1 mM PVP 2%	$MgCl_2$ 4 mM $ZnSO_4$ 0.1 mM	$MgCl_2$ 4 mM PVP 2%
1	2	3	4	5	6	7	8

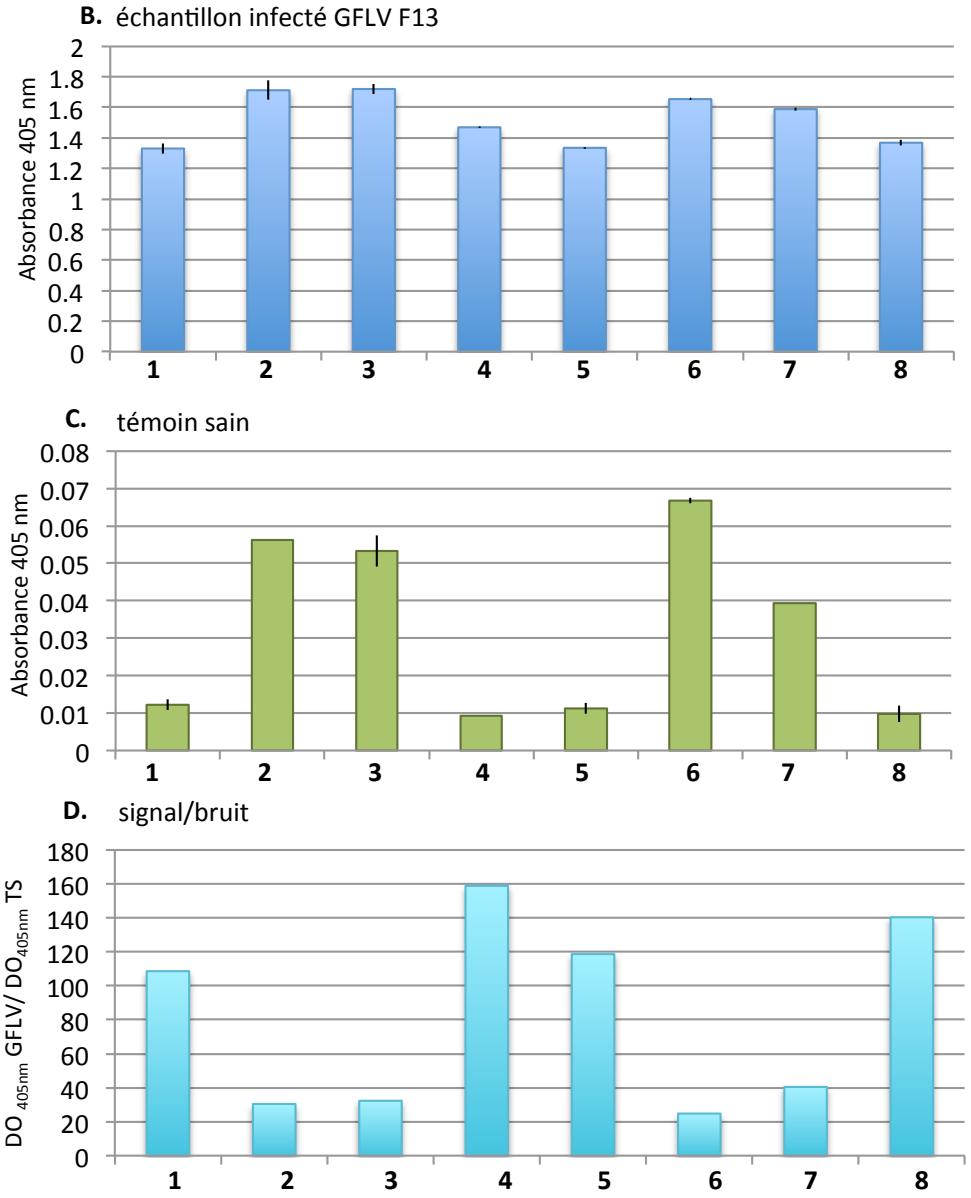


Figure 4.25. Effet de la présence de $ZnSO_4$, $MgCl_2$ et polyvinylpyrrolidone (PVP 24 kDa) dans le tampon conjugué sur la performance du DAS-ELISA utilisant des réactifs Nb. **(A)** Liste des composés ajoutés au tampon conjugué. **(B)** Détection du GFLV dans un échantillon de vigne infecté par le GFLV-F13 par le Nb p75-PAL dilué au 1:500 dans les différents tampons conjugués. Les chiffres en abscisses correspondent aux tampons présentés dans le panneau A. **(C)** Réactivité du Nb p75-PAL dilués dans les différents tampons contre de l'extrait de vigne saine. Les chiffres en abscisses correspondent aux tampons présentés dans le panneau A. **(D)** le graphique présente le rapport de la DO_{405nm} obtenue pour l'échantillon virosé sur celle obtenue pour le témoin sain. Plus ce rapport est important, plus la détection est sensible. La capture des particules virales est réalisée grâce aux Cb p75-TR et 125-TR dilués au 1:1000.

2. Optimisation du tampon conjugué

Deux types de tampon conjugué sont généralement proposés dans les tests ELISA pour la détection de phytovirus, l'un à base de tampon Phosphate (tampon PBS utilisé habituellement par l'INRA de Colmar et l'IFV), l'autre à base de Tris (tampon TBS, proposé par Bioreba). Il ressort de la littérature que les ions phosphates sont connus pour inhiber l'activité de la PAL de mammifère (Fernley et Walker, 1967) et peuvent modifier l'équilibre enzymatique lors de la dégradation du substrat. Lors des lavages et du dépôt du réactif de détection, il est pratiquement certain que des ions phosphates demeurent dans la plaque ELISA au moment de l'ajout du substrat. J'ai donc choisi de développer un tampon conjugué Nb à base de Tris (TBS) additionné de 0,05% de Tween 20.

Du magnésium étant présent dans le tampon conjugué Bioreba, son effet dans le tampon conjugué a donc été investigué pour le test Nb. Le zinc pouvant également influencer l'activité enzymatique de la PAL, l'effet de la présence de ce composé dans le tampon conjugué a été investigué en parallèle. Le tampon conjugué Bioreba est également composé de polyvinilpyrrolidone (PVP) à hauteur de 2%. Le PVP, utilisé à une concentration de 2% dans le tampon conjugué Bioreba, permet de limiter l'impact négatif des polyphénols et des tanins contenus dans un extrait brut de vigne sur l'activité de la phosphatase alcaline. L'ensemble de cette analyse de la composition des tampons conjugué m'a conduit à évaluer l'impact de la présence du magnésium, du PVP et du zinc dans le tampon conjugué sur l'activité de la PAL fusionnée aux Nb.

L'effet des différents composés a été évalué par DAS-ELISA en utilisant les Nb p75-TR et 125-TR pour l'étape de coating dilués au 1:2000 et le Nb p75-PAL dilué au 1:500, comme réactif de détection. Les résultats sont présentés dans les figures 4.25 et 4.26. Ce test, composé uniquement de Nb, montre clairement la capacité de reconnaissance de la souche de référence, le GFLV-F13, et atteste de la fonctionnalité d'un test composé uniquement de Nb. Si cette fois la présence de 0.1 mM de $ZnSO_4$ engendre les meilleures absorbances mesurées pour l'échantillon de vigne infectée par le GFLV-F13 (figure 4.25.B), l'absorbance du témoin sain est en moyenne 4,5 fois plus élevée en présence de zinc (statistiquement évalué par un test de Student, p-value=0.0003 ; $0DO_{405nm}$ TS=0.01 à 0.012 en absence de zinc contre 0.039 à 0.067 en présence de zinc ; figure 4.25C). Les rapports signaux/bruit sont donc nettement réduits en présence de $ZnSO_4$; ce qui m'a conduit à écarter ce composé du tampon conjugué.

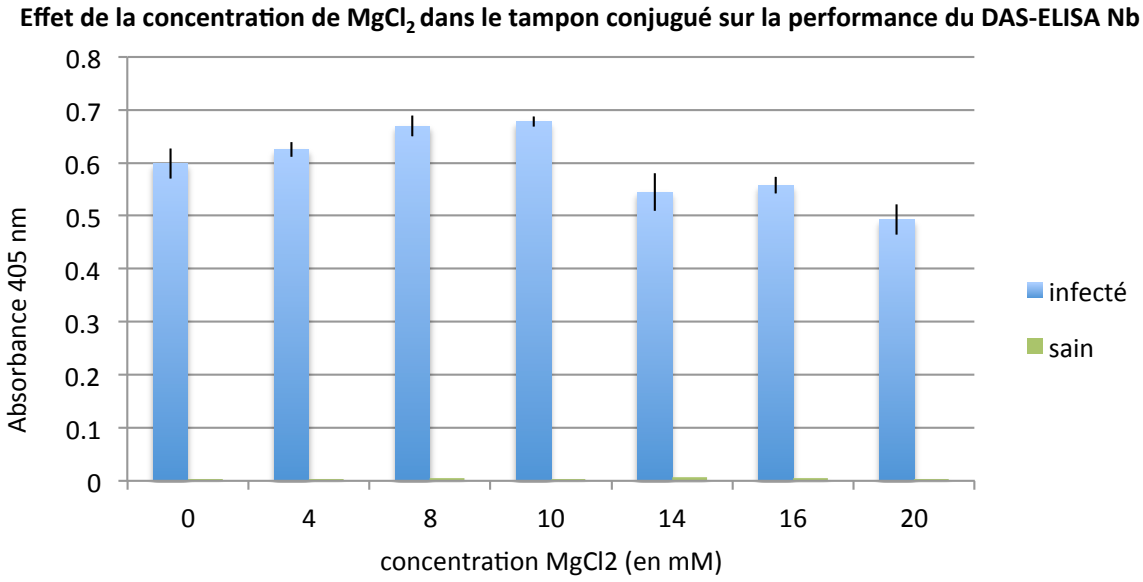


Figure 4.26. **Impact de la concentration de $MgCl_2$ dans le tampon conjugué** sur la performance de détection du GFLV. Le Nb p75-PAL a été utilisé comme réactif de détection dilué au 1:500 dans du tampon conjugué (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,2% BSA, 2% PVP) contenant ou non du $MgCl_2$ en concentration croissante. La capture des particules virales contenues dans un échantillon de vigne infectée par le GFLV-F13 est réalisée avec les Cb p75-TR et 125-TR dilués au 1:1000.

La présence de PVP dans le tampon conjugué semble induire à la fois une légère augmentation du signal pour les échantillons infectés et une diminution du signal pour les échantillons sains, conduisant aux meilleurs rapports signaux/bruit du test (figure 4.25.D). La concentration en magnésium du tampon conjugué joue également un rôle dans l'intensité du signal. Celle-ci a été optimisée en DAS-ELISA, basé sur les mêmes Nb et Cb que précédemment, en testant des concentrations croissantes de $MgCl_2$, de 0 à 20 mM (figure 4.26). L'augmentation du signal est corrélée à l'augmentation de la concentration en $MgCl_2$ jusqu'aux concentrations de 8 à 10 mM, au-dessus desquelles le signal diminue. L'effet de l'ajout de $MgCl_2$ a été statistiquement évalué par le test Anova (p-value<0,001) suivi du test de Tukey. L'ajout de 4 mM de MgCl2 dans le tampon conjugué ne permet pas d'augmenter significativement le signal du test (p-value= 0.8) alors que l'ajout de 8 et 10 mM augmentent significativement l'intensité du signal (p-value= 0,03 et 0,01 respectivement). La concentration en $MgCl_2$ du tampon conjugué n'ayant pas d'effet sur les valeurs d'absorbance du témoin sain (statistiquement évalué par le test Anova, p-value=0,378), la composition du tampon conjugué a donc été établie pour ajouter 10 mM de $MgCl_2$ et 2% de PVP à un tampon Tris 50 mM pH8, 200 mM NaCl, 0.2% BSA, 0.05% Tween-20.

3. Optimisation du tampon substrat

Après avoir optimisé le tampon conjugué, je me suis intéressée au tampon substrat. Ce dernier est généralement dépourvu de magnésium (comme celui commercialisé par Bioreba), mais Crowther (2001), indique que le magnésium à la concentration d'1 mM peut favoriser la réaction enzymatique catalysée par la PAL et ainsi contribuer à une dégradation plus rapide du para-nitrophenylphosphate (pNPP). Compte-tenu de ces éléments et des résultats quant à l'importance du magnésium dans le tampon conjugué, j'ai testé l'effet de deux concentrations de $MgCl_2$ (0.1 mM et 1 mM) dans le tampon substrat, pour la révélation du DAS-ELISA Nb. Pour cela, les Nb p75-TR et 125-TR dilués au 1:2000 ont été utilisés lors de l'étape de coating et les Nb p59-PAL, p75-PAl ou 155-PAL dilués au 1:500 individuellement en détection (figure 4.27). Les absorbances mesurées montrent que la présence de $MgCl_2$ dans le tampon substrat est essentielle à l'activité de la PAL mutée et conduit à un signal significativement plus élevé (statistiquement évalué par un test de Student, p-value<<0,0001). En effet, des différences allant jusqu'à un facteur neuf sont observées dans le cas du Nbp75-PAL et du Nb155-PAL en présence de 1 mM de $MgCl_2$ (respectivement

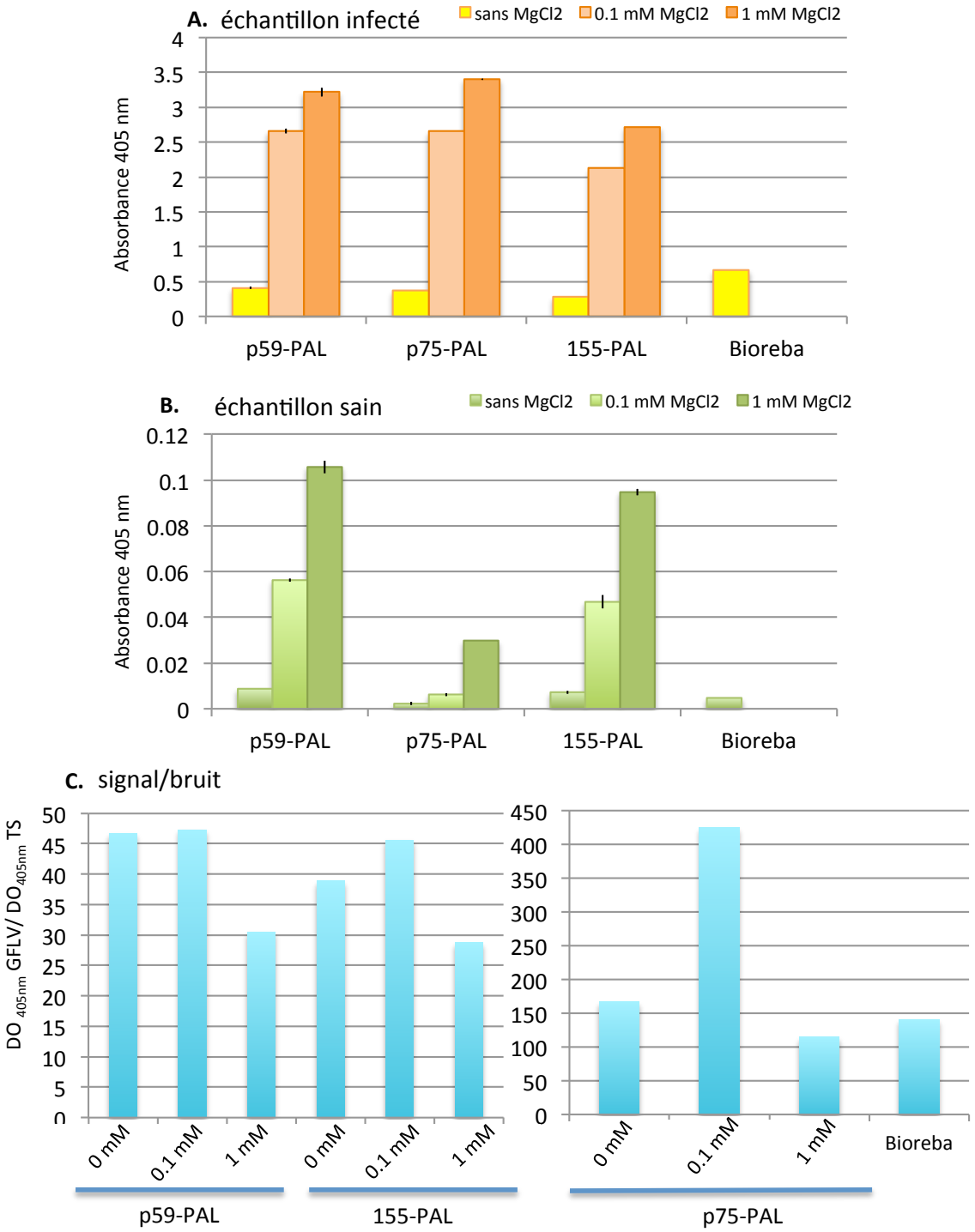


Figure 4.27. **Effet de la concentration de $MgCl_2$ dans le tampon substrat** sur le signal du DAS-ELISA Nb. La réactivité des Nb p59-PAL, p75-PAL et 155-PAL dilués au 1:500 a été évaluée contre un échantillon de vigne infecté par le GFLV-F13 **(A)** et contre un échantillon de vigne saine **(B)** L'étape de coating a été réalisée avec les Cb p75-TR et 125-TR dilués au 1:2000. Le pNPP a été dissout dans un tampon substrat classique ou additionné de 0,1 ou 1mM $MgCl_2$. **(C)** Représentation graphique du rapport DO_{405nm} des échantillons infectés sur les échantillons sains pour les 3 Nb fusionnés à la PAL et incubés dans du tampon substrat avec ou sans $MgCl_2$. Quatre graphiques sont présentés pour cette expérience, afin de mieux visualiser les différences des témoins sains et les différents signaux/bruit, les résultats signaux/bruit du Nb p75-PAL présentant des valeurs dix fois plus élevée que celles des deux autres Nb-PAL.

DO_{405nm}=3.40 et 2.75) par rapport à tampon substrat sans $MgCl_2$ (DO_{405nm}=0.375 et 0.282). Bien que légèrement plus modeste, l'augmentation de signal atteint tout de même un facteur 8 pour le Nb p59-PAL en présence de 1 mM de $MgCl_2$. Si le signal mesuré pour l'échantillon infecté en présence de 1 mM de $MgCl_2$ est supérieur à celui mesuré avec 0,1 mM de $MgCl_2$ (statistiquement évalué par le test de Student, p-value=0,004 ; figure 4.27.A), la valeur des témoins sains et donc du bruit de fond est par contre elle aussi toujours plus élevée à plus forte concentration de $MgCl_2$ (statistiquement évalué par le test de Student, p-value=0,04; figure 4.27.B). D'une manière générale, les meilleurs rapports signal/bruit (figure 4.27.C) sont observés en présence de 0.1 mM de $MgCl_2$ et ce, quel que soit le Nb-PAL utilisé. Ceci est particulièrement remarquable dans le cas du Nb p75-PAL qui génère le signal le plus fort en présence de GFLV et moins de bruit de fond contre le témoin sain.

Ces résultats démontrent l'importance du $MgCl_2$ pour l'étape de révélation et ont conduit à utiliser le tampon substrat (1M diethanolamine pH 9.2) additionné de 0.1 mM $MgCl_2$ dans la suite de mes travaux. Ces résultats ont aussi révélé que le Nb p75-PAL est de loin le plus performant pour la détection du GFLV-F13 et probablement de nombreux autres isolats d'après mes résultats précédents (paragraphe I.B.). Ces derniers résultats ont surtout permis de démontrer qu'il est possible de concevoir un ELISA fonctionnel en 4 étapes, exclusivement basé sur l'utilisation de Nb.

V. Évaluation des Nb-PAL en tant que réactifs de détection

Afin d'évaluer l'impact de la fusion des Nb à la PAL sur le spectre de reconnaissance des NbPAL, les Nb-PAL p59, p75 et 155 ont été testés individuellement selon la procédure ELISA hybride décrite figure 4.5, en utilisant les anticorps polyclonaux commerciaux anti-GFLV en coating pour capturer les différents isolats de GFLV des collections de vignes infectées de l'INRA de Colmar et les Nb-PAL lors de l'étape de détection (figure 4.28). Le Nb p75-PAL est le Nb qui donne globalement le meilleur signal et permet la détection de tous les échantillons bois et feuilles de vigne testés, y compris l'isolat GFLV-BYM47, qui n'était pas reconnu lors du premier criblage par les Nb p75-6HisST (voir figure 4.5). Le Np59-PAL, légèrement moins performant que le Nb p75-PAL en terme d'intensité du signal, permet la détection de tous les isolats testés à l'exception de l'isolat GFLV-Ch. H125. Ce Nb-PAL ne reconnaît que très faiblement l'isolat GFLV-Lavallée. Lors du premier criblage de la collection de l'INRA de Colmar, ces deux isolats n'étaient pas détectés par les Nb p59-6HisST. Le Nb

Figure 4.28. **Analyse du spectre de reconnaissance des trois Nb-PAL** (p75, p59 et 155) en DAS-ELISA hybride contre des échantillons de vignes de la collection de l'INRA de Colmar infectés par le GFLV. Le test a été réalisé selon la procédure hybride décrite figure 4.5 en utilisant les Nb-PAL dilués au 1:500. Les particules virales ont été capturées avec des anticorps polyclonaux anti-GFLV commerciaux.

155-PAL est le Nb qui génère le signal le plus faible. Il ne reconnaît ni les échantillons CF B844, ni GHu, ni BE-4-11 et ne détecte que faiblement les échantillons extraits de bois infectés par les isolats Ch. H125 et Ch.T59. Lors du premier criblage de la collection de l'INRA de Colmar, ces échantillons n'étaient pas détectés par le Nb 155-6HisST.

In fine, il ressort que plusieurs isolats de GFLV, non détectés par les Nb p59, p75 et 155 lors du premier test de criblage de la collection de l'INRA de Colmar par les Nb portant l'étiquette StrepTag, ont été diagnostiqués positifs avec les Nb-PAL. Les deux tests ont été réalisés à deux ans d'intervalle contre des échantillons feuilles prélevés à la même période de l'année (au mois de juin) mais à un an d'intervalle et stockés à -80°C ce qui pourrait expliquer certaines différences observées. La valeur d'absorbance pour l'isolat GFLV-BYM47 par le test Bioreba a été mesurée à 0.739 lors du premier criblage et à 1.331 lors du deuxième test, réalisé 2 ans plus tard. La détection de cet échantillon par le Nb p75-PAL pourrait s'expliquer par une augmentation de la charge virale dans cet échantillon, comparée au test précédant. Le p75 possède peut être une affinité plus faible pour cet isolat de GFLV et le système de révélation de l'ELISA par le complexe Sav-PAL ne permettait peut être pas une révélation aussi efficace que par les Nb-PAL. Ces différences pourraient également s'expliquer par la distribution irrégulière du virus dans les ceps infectés, d'où, l'importance de l'échantillonnage et de la nécessité de reproduire les tests. Quoi qu'il en soit, il apparaît que la sélection initiale des Nb sur la base du test Nb-6HisST était judicieuse car elle confirme l'importance du Nb p75, qui à lui seul, semble susceptible de reconnaître l'ensemble des isolats de nos collections, aussi bien sur les échantillons feuilles que sur bois.

VI. Élaboration d'un test complet Nb DAS-ELISA anti-GFLV

Après avoir validé l'utilisation des Nb comme réactifs de coating et de détection, après avoir réduit le nombre d'étapes du test Nb pour s'aligner sur celles du test commercial et finalement après avoir validé la fonctionnalité des Nb dans un test composé uniquement de Nb pour la détection de la souche de référence GFLV-F13 dans un échantillon de vigne infectée, il m'incombait finalement de comparer la performance du test Nb par rapport aux kits commerciaux utilisés en diagnostic, et particulièrement le test commercial Bioreba qui est l'un des plus performants sur le marché à ce jour.

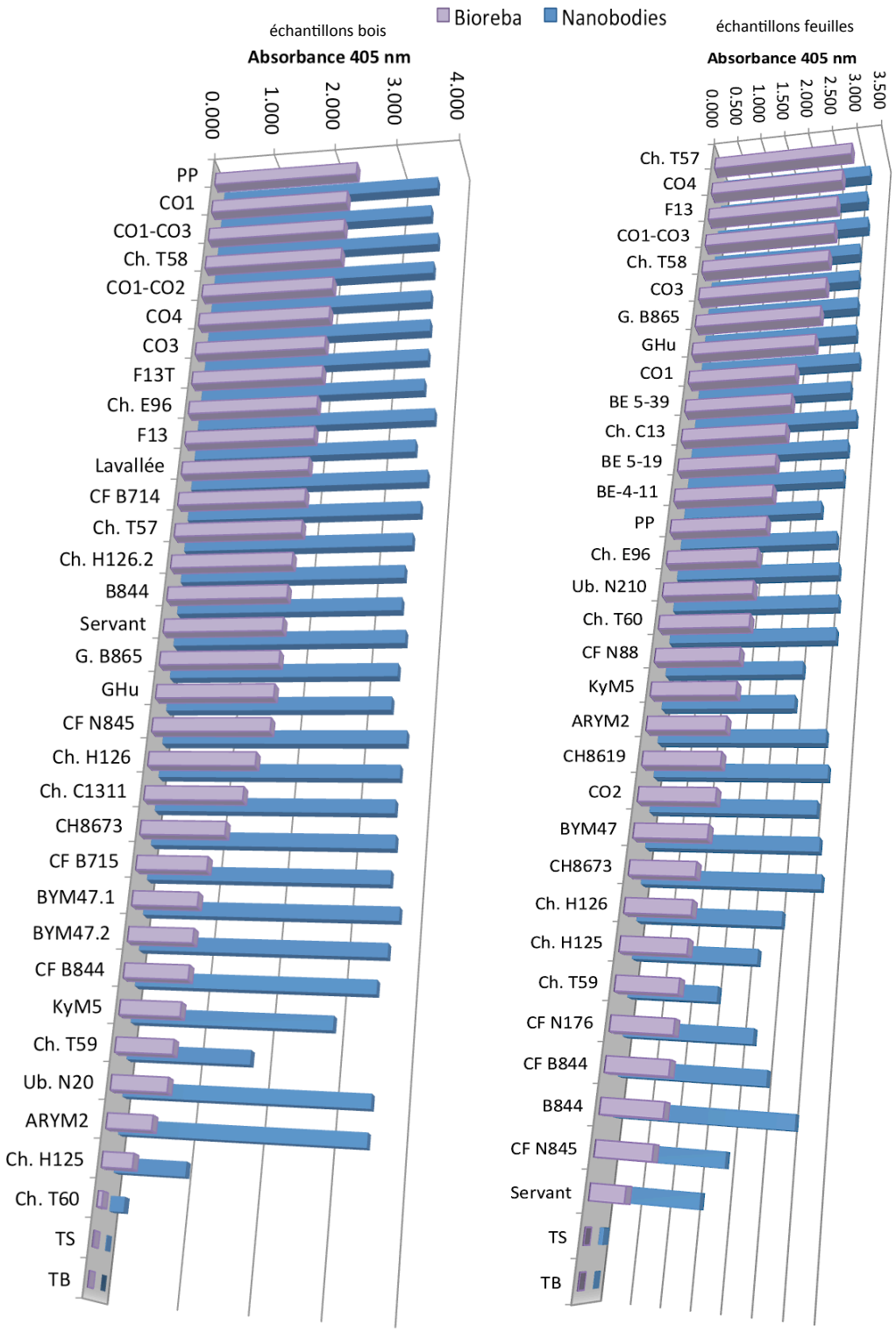


Figure 4.29. DAS-ELISA Nb (en bleu) comparé au test DAS-ELISA commercial (en violet) contre des échantillons de vignes infectées provenant de la collection de l'INRA de Colmar. Le test Nb a été réalisé grâce aux Cb p75 et 125 fusionnés à la TagRFP dilués au 1:2000 pour la capture des particules virales et aux Nb p59, p75 et 155 fusionnés à la PAL dilués au 1:1500 pour l'étape de détection. Les tests ont été effectués avec des feuilles congelée à-80°C et avec des bois de vigne récoltés pendant la saison hivernale 2015.

Pour cela, j'ai tout d'abord défini le protocole comme suit : les Nb-TR p75 et 125 ont été dilués au 1:2000 dans le tampon coating Bioreba et déposés dans les plaques ELISA. Les plaques ont été incubées 3 heures à 37°C. Après lavage des plaques avec une solution TBS-Tween, les échantillons de vignes infectés broyés dans le tampon Vigne Bioreba ont été déposés dans les puits de la plaque ELISA. La plaque a ensuite été incubée à 4°C pendant une nuit. Après lavage de la plaque au TBS-Tween, les Nb-PAL p75, 155 et p59 dilués chacun au 1 :1500 dans le tampon conjugué Nb optimisé ont été déposés dans les puits. Après une incubation de 2 heures à température ambiante et lavage au TBS-Tween 20, le pNPP dilué à la concentration de 1mg/ml dans le tampon substrat optimisé a été déposé dans les puits. L'absorbance a été mesurée après 2 heures d'incubation à température ambiante.

1. Comparaison du test complet Nb et du test Bioreba sur des échantillons de feuilles et de bois de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar

Le test Nb complet décrit ci-dessus, composé des Nb p75-TR et 125-TR en coating et des Nb p75, p59 et 155-PAL en détection, a été comparé au test commercial sur la base de 35 isolats de GFLV issus du broyage de bois ou de feuilles de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar (figure 4.29). J'ai pris la précaution de réaliser les deux tests simultanément et dans les mêmes conditions expérimentales, afin d'autoriser les comparaisons. Il apparaît que 32/32 échantillons feuille et 32/32 échantillons bois sont diagnostiqués positifs avec les deux types de tests, attestant que le spectre de reconnaissance du test Nb est identique à celui du test Bioreba. De manière remarquable, les valeurs d'absorbance mesurées avec les tests Nb sont toutes supérieures à celles du test Bioreba et ce, aussi bien pour les échantillons issus de feuilles que de bois de vigne. Les valeurs d'absorbance des témoins sains, sont plus élevées pour le test Nb sur les échantillons feuilles (évalué statistiquement par un test de Student, p-value= 0.025) mais sont comparables à celles du test Bioreba pour les échantillons bois (évalué statistiquement par un test de Student, p-value= 0.790). Ceci pourrait s'expliquer par la différence de concentration du matériel végétal testé puisque le protocole à l'INRA de Colmar consiste à broyer les feuilles à raison de 1 g pour 5 ml de tampon et les bois à raison de 1 g pour 10 ml de tampon.

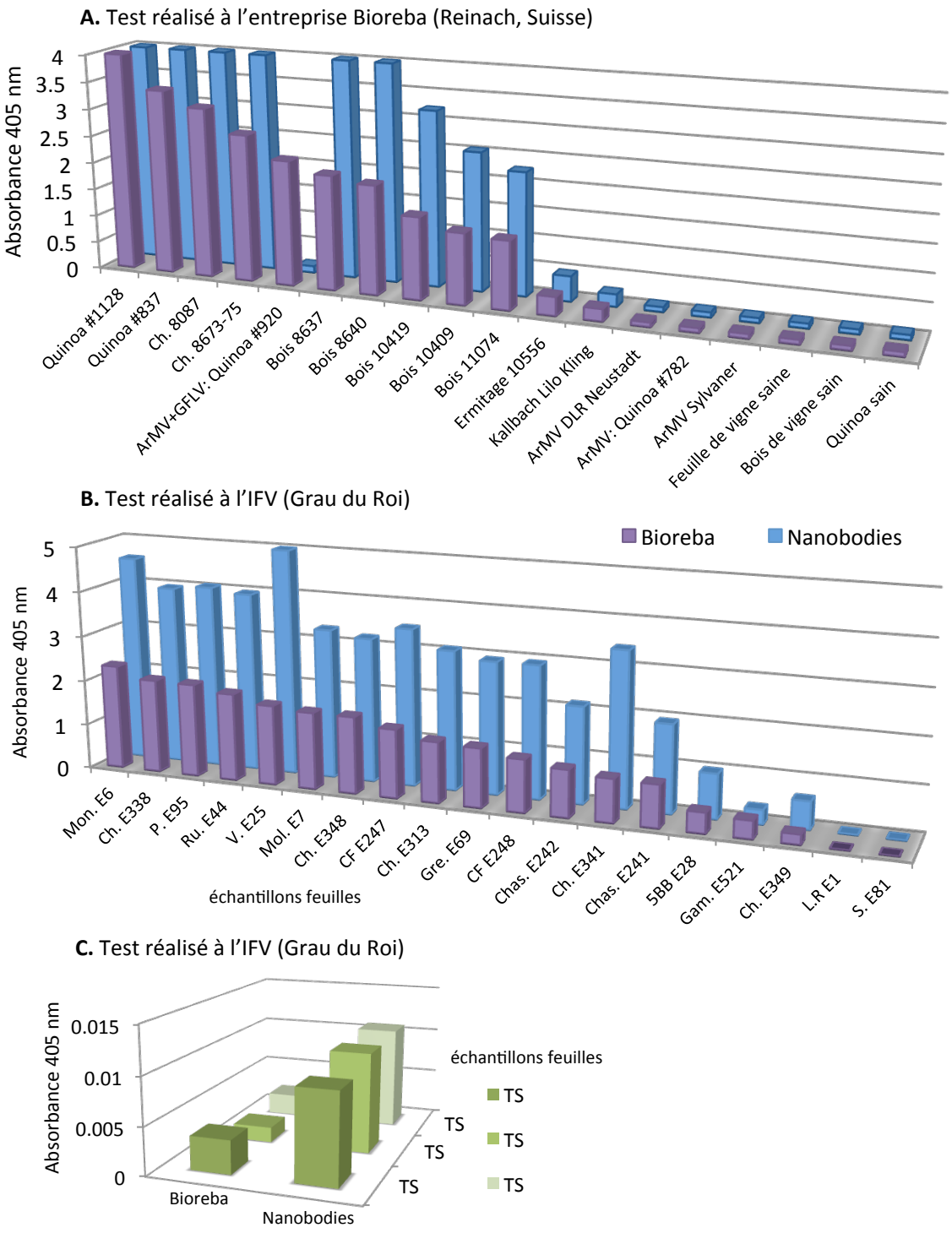


Figure 4.30. **DAS-ELISA Nb (en bleu) comparé au test DAS-ELISA commercial Bioreba (en violet)** contre des échantillons de vignes infectées des collections de l'entreprise Bioreba **(A)** et de l'IFV **(B)** et des échantillons sains **(C)**. Le test Nb a été réalisé grâce aux Cb p75 et 125 fusionnés à la TagRFP dilués au 1:2000 pour la capture des particules virales et aux Nb p75, p59 et 155 dilués au 1:1500 fusionnés à la PAL pour l'étape de détection, contre des échantillons de feuilles et de bois de vigne. Pour les expériences menées à l'IFV, deux graphiques sont présentés afin de mieux visualiser les différences des témoins sains pour les deux types de tests.

2. Reproductibilité du test ELISA Nb

Afin de vérifier la reproductibilité du DAS-ELISA Nb (capacité à obtenir le même type de résultat un jour différent par un opérateur et des appareillages différents), les réactifs Nb ont été testés par l'entreprise Bioreba et par l'IFV afin d'analyser leurs collections d'isolats de GFLV respectives, et ainsi vérifier l'efficacité du test Nb en le comparant au kit commercial anti-GFLV.

A. Expériences menées à l'entreprise Bioreba (Reinach, Suisse)

Le test complet Nb a été évalué par l'entreprise Bioreba contre onze échantillons infectés par le GFLV, trois échantillons infectés par l'ArMV et un échantillon infecté à la fois par l'ArMV et le GFLV (figure 4.30.A). Contrairement aux tests précédents, calqués sur les pratiques de l'IFV, le volume des anticorps déposé dans les puits était de 200 µl (au lieu de 100 µl) comme préconisé par le protocole Bioreba. Comme pour les échantillons de l'INRA de Colmar, tous les échantillons bois et feuilles infectés par le GFLV seul présentent des valeurs d'absorbances supérieures avec le test Nb. Contrairement au test précédent, les valeurs d'absorbance des témoins sains sont comparables pour les deux tests Nb aussi bien sur feuilles que sur bois (évalué par un test de Student, p-value=0,106). Ceci s'explique certainement par le fait que tous les échantillons ont été broyés à la concentration identique de 1 g de tissus par 20 ml de tampon de broyage, comme préconisé par le protocole Bioreba. Si tel est le cas, adopter la procédure de broyage utilisée par Bioreba serait suffisant pour résoudre le léger problème du bruit de fond généralement observé pour les échantillons feuilles avec le test Nb.

Par ailleurs, le test Nb, tout comme le test Bioreba anti-GFLV se sont révélés incapables de détecter les échantillons ArMV, confirmant la spécificité du test Nb anti-GFLV. Seul l'échantillon Quinoa #920 co-infecté par l'ArMV et le GFLV s'est avéré positif avec le test Bioreba et négatif avec le test Nb. Il conviendrait de séquencer les gènes codant pour la protéine de capside des virus présents dans cet échantillon afin d'en déterminer la phylogénie exacte. Une hypothèse concernant cette absence de reconnaissance par les Nb anti-GFLV est proposée chapitre 5 paragraphe V.

Test réalisé à l'entreprise Bioreba (Reinach, Suisse)

	Absorbance à 405 nm après 2h	
	Bioreba	Nanobodies
Lyo	4	4
Lyo 1:2	4	4
Lyo 1:4	3.954	4
Lyo 1:8	2.372	4
Lyo 1:16	1.236	2.273
Lyo 1:32	0.678	1.221
Lyo 1:64	0.386	0.667
Lyo 1:128	0.232	0.362
Lyo 1:256	0.159	0.225
Lyo 1:512	0.121	0.158
Lyo 1:1024	0.104	0.125
Lyo 1:2048	0.094	0.106
sain	0.086	0.092
seuil de positivité	0.1892	0.2024

Figure 4.31. **Analyse comparative des dilutions séquentielles du témoin positif** (Lyo) fourni avec le kit de détection du GFLV Bioreba et correspondant à des feuilles de *C. quinoa* infectées lyophilisées. Le test Nb a été réalisé grâce aux Cb p75 et 125 fusionnés à la TagRFP dilués au 1:2000 pour la capture des particules virales et aux Nb p75, p59 et 155 dilués au 1:1500 fusionnés à la PAL pour l'étape de détection. Le tableau contient les valeurs numériques de l'absorbance mesurée après 2h d'incubation du substrat. Les cases vertes indiquent une détection du GFLV et les rouges une absence de détection. Dans les cases en orange sont indiqués les valeurs du seuil de positivité de chaque DAS-ELISA. Ce test a été réalisé au sein de l'entreprise Bioreba (Reinach, Suisse).

B. Expériences menées à l'Institut Français de la Vigne et du Vin (Grau du Roi)

Le test complet Nb a été évalué par l'IFV contre dix-sept échantillons de feuilles de vignes infectées par le GFLV et deux échantillons infectés par l'ArMV en parallèle au test Bioreba (figure 4.30.B). Les concentrations de broyage étaient de 1 g pour 5 ml de tampon, et le volume d'échantillon déposé par puits de 100 µl pour le test Nb et le test Bioreba. Cette fois encore, la détection de la totalité des échantillons infectés par le GFLV a montré des absorbances supérieures avec le test Nb comparé au test Bioreba. L'analyse des témoins sains montre à nouveau une légère différence entre les tests Nb et Bioreba (figure 4.30.C respectivement DO_{405}=0.008 et 0.002 ; différence évaluée par le test de Student, p-value=0,0003).

3. Sensibilité et seuil de détection du GFLV en DAS-ELISA

Les paramètres importants d'un test de diagnostic sont sa spécificité, sa sensibilité et son seuil de détection, essentiels pour révéler la présence du pathogène même à faible concentration. Le seuil de détection, concentration en antigène en dessous de laquelle le test est négatif, est généralement de l'ordre du nanogramme en DAS-ELISA. La limite de détection du GFLV en DAS-ELISA composé d'anticorps conventionnels a été estimée entre 1.5 ng et 0.75 ng par Fuchs *et al.,* (1991) sur des échantillons de *C. quinoa* infectés.

Afin de comparer la sensibilité relative des tests Bioreba et Nb, des dilutions de deux en deux d'un échantillon infecté par le GFLV ont été testées. Pour toutes les dilutions, les absorbances mesurées sont supérieures pour le test Nb comparé au test commercial Bioreba (figure 4.31). La valeur d'absorbance du témoin sain du test Bioreba est de 0.086 et de 0.092 pour le test Nb. En appliquant le calcul du seuil de positivité (2.2 fois la moyenne de DO du témoin sain), soit 0.189 pour le test Bioreba et 0.202 pour le test Nb, le DAS-ELISA Bioreba est positif jusqu'à la dilution 1:128 alors qu'il est positif jusqu'à la dilution 1:256 pour le test Nb, suggérant un seuil de détection plus bas pour le test Nb.

Afin de déterminer précisément le seuil limite de détection des deux tests, le test complet Nb a été comparé au test Bioreba contre un échantillon de vigne saine additionné de GFLV-F13 purifié puis dilué de deux en deux (figure 4.32.A). Quelles que soient les dilutions, les valeurs d'absorbance sont toutes supérieures pour le test Nb. La différence de signal entre le test Nb et le test Bioreba est d'autant plus importante que la concentration

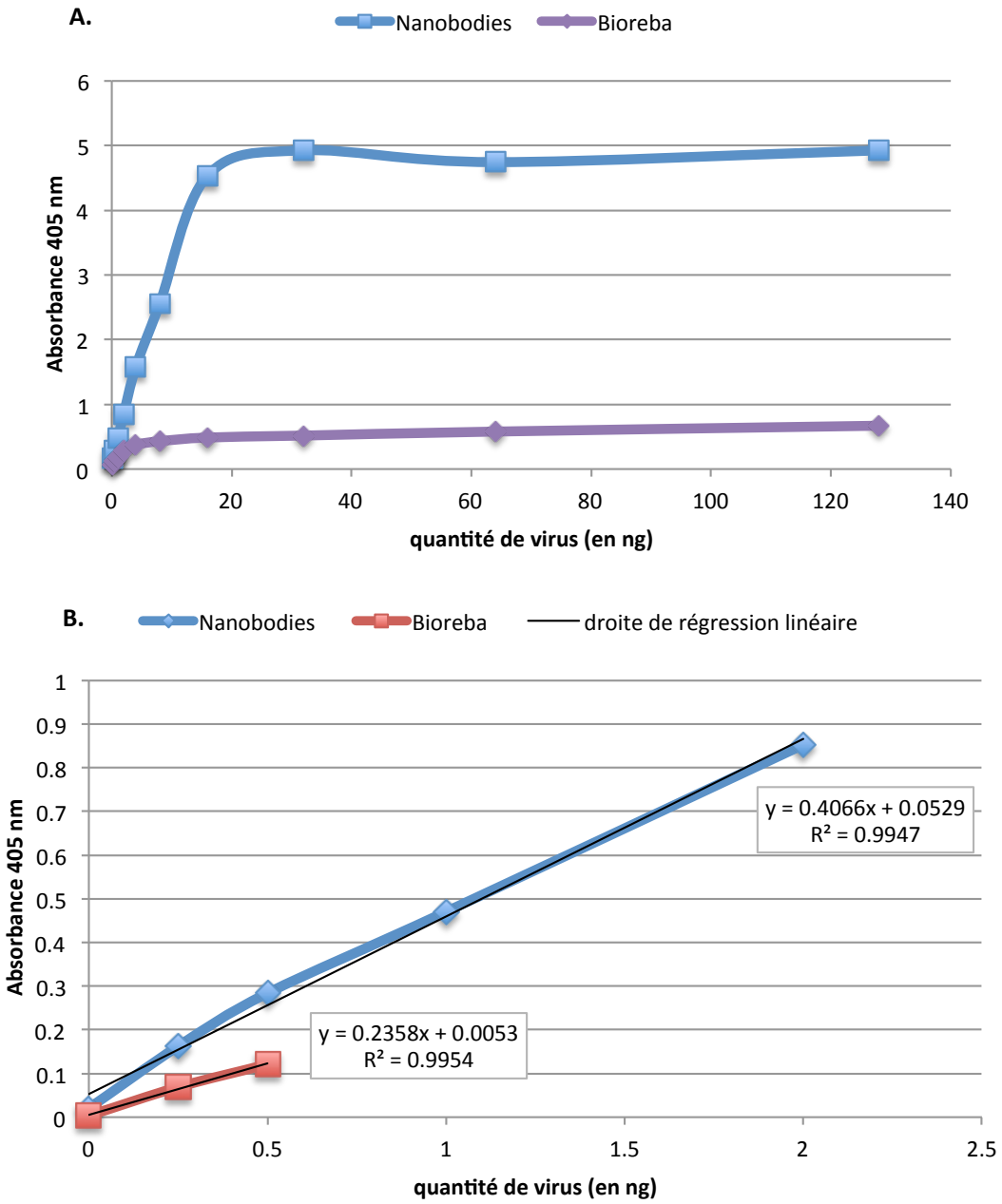


Figure 4.32. Comparaison des seuils limites de détection du GFLV par le test Nb complet et le test Bioreba. (A) Détection du GFLV par le DAS-ELISA Nb (en bleu) et le DAS-ELISA commercial (en violet) dans un échantillon de feuille de vigne saine additionnée de différentes quantités de GFLV-F13 purifié. Le test a été réalisé grâce aux Nb p75 et 125 fusionnés à la TagRFP dilués au 1:2000 pour la capture des particules virales et aux Nb p75, p59 et 155 fusionnés à la PAL dilués au 1:1500 pour l'étape de détection. La lecture a été réalisée 30 minutes, 1 heure puis 2 heures après le dépôt du substrat. **(B)** La courbe de régression des plus faibles dilutions donnent les équations permettant de déterminer un seuil de détection théorique des deux tests, établies avec un coefficient de corrélation (R^2).

virale est élevée. La valeur d'absorbance du témoin sain du test Nb, bien que très faible, est plus élevée qu'avec le test Bioreba (0.026 contre 0.003) conférant un seuil de positivité de 0.057 pour le test Nb et 0.0066 pour le test Bioreba. Les droites de régression linéaires ont été calculées pour les deux tests, et les équations permettant de déterminer un seuil de détection théorique ont été établies avec un coefficient de corrélation très élevé (supérieur à 0.99 pour les deux tests (figure 4.32.B). Au seuil de positivité, la quantité de virus théorique calculée selon des équations est de 10 pg pour le test Nb et de 5.1 pg pour le test Bioreba, quantités bien inférieures à celles usuellement détectées en ELISA (Crowther, 2001), mais aussi inférieure à celles des tests utilisant des Nb-PAL comme réactif de détection (Swain *et al.,* 2011, Liu *et al.,* 2015).

L'ensemble des résultats des tests réalisés à l'INRA de Colmar, à l'entreprise Bioreba et à l'IFV, atteste de la détection de l'ensemble des isolats de GFLV des différentes collections par le DAS-ELISA Nb, suggérant ainsi la sensibilité de cette méthode de diagnostic et son efficacité par rapport à un test commercial, ce qui était l'objectif initial de ma thèse. Cet objectif était de développer un test de détection du GFLV basé intégralement sur des Nb, visant à remplacer avantageusement les anticorps conventionnels tant du point de vue des coûts de production que de la sensibilité, de la spécificité ou encore du seuil de détection. La production de Cb et de Nb-PAL en bactéries permet de s'affranchir des manipulations animales et de culture cellulaire, et ne nécessite aucun réactif supplémentaire, réduisant le temps et le coût d'obtention des réactifs de détection. Les expériences menées en parallèle à l'INRA de Colmar, à l'entreprise Bioreba et à l'IFV attestent de l'efficacité du test Nb tant du point de vue du signal généré que d'un point de vue de sa sensibilité et de sa spécificité, comparé à un test commercial. Enfin, j'ai pu montrer que ce test est reproductible ce qui ouvre la voie à sa commercialisation et suscite l'intérêt de l'entreprise Bioreba. La répétabilité de ce test de diagnostic (capacité d'un test de diagnostic à reproduire les mêmes résultats par un même opérateur avec des réactifs et un appareillage identique sur les mêmes échantillons) reste tout de même encore à vérifier. Une campagne de détection des virus du court-noué par DAS-ELISA en cours, menée par l'IFV et effectuée contre plus de 300 échantillons de vigne prélevés dans des parcelles de différentes localisations géographiques, devrait permettre de comparer encore plus exhaustivement la sensibilité et la spécificité du test Nb et de plusieurs tests commerciaux dans les mois à venir, et ainsi, confirmer la

pertinence d'un test Nb pour la détection du GFLV à grande échelle. La même campagne de détection sera également prochainement effectuée par l'INRA de Colmar en Alsace.

En plus des Nb anti-GFLV, s'est présentée au cours de ma deuxième année de thèse, l'opportunité de développer un DAS-ELISA Nb anti-ArMV, l'autre népovirus principalement impliqué dans la maladie du court-noué de la vigne en Europe.

Résultats

Chapitre V. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic de l'*Arabis mosaic virus*

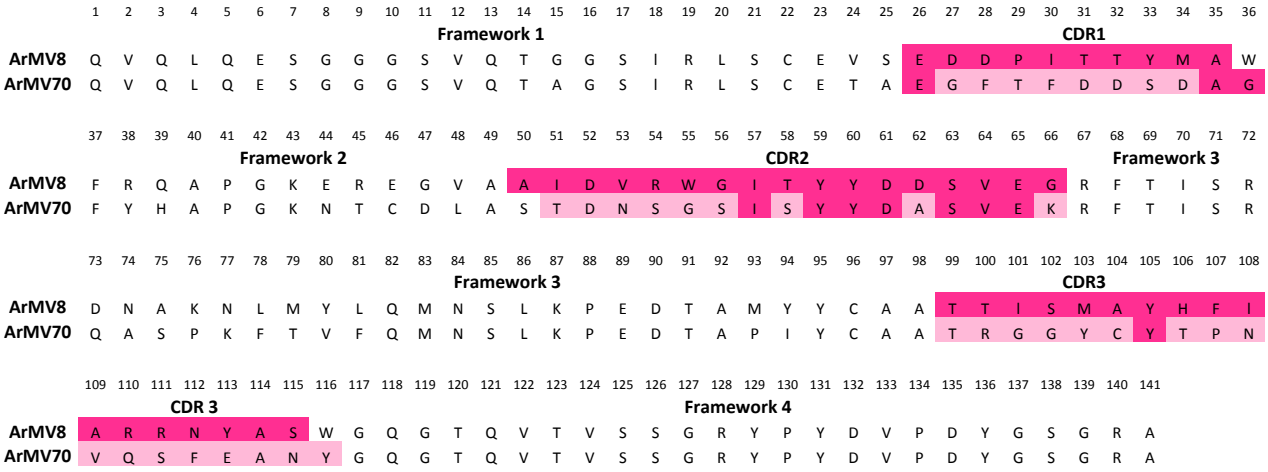


Figure 5.1. Alignement des séquences protéiques des deux Nb anti-ArMV issus de la banque de Nb anti-GFLV, identifiés par phage display contre de l'ArMV-S purifié.

Chapitre V. Les Nanobodies comme réactifs de diagnostic contre l'*Arabis mosaic virus*

L'*Arabis mosaic virus* est le deuxième principal agent responsable de la maladie du court-noué. Il se retrouve majoritairement dans les vignobles européens, mais est également présent dans une moindre mesure en Amérique du nord, en Asie du sud-est et en Australie, où il est à l'origine de symptômes similaires à ceux engendrés par le GFLV (Martelli, 2014). Ce virus est spécifiquement transmis par le nématode *Xiphinema diversicaudatum* (Harrison et Cadman, 1959) et possède une gamme d'hôte beaucoup plus large que celle du GFLV, qui s'étend à d'autres espèces ligneuses d'intérêt agro-économique comme les fraisiers, les framboisiers ou encore de nombreux arbres fruitiers. À l'instar du GFLV, l'ArMV est considéré comme un virus réglementé et entre donc dans le programme obligatoire de certification sanitaire. À ce titre, il semblait donc judicieux d'investiguer la possibilité de diagnostiquer ce virus à l'aide de Nanobodies® (Nb) en remplacement des tests sérologiques conventionnels.

I. Recherche de Nb anti-ArMV parmi les Nb anti-GFLV

Les capsides du GFLV et de l'ArMV présentant des similarités de séquences (67-68% d'identité de séquence nucléotidique, Vigne *et al.,* 2008) il était concevable que parmi les Nb anti-GFLV, il y en ait qui puissent réagir de manière croisée avec l'ArMV, des anticorps monoclonaux anti-GFLV reconnaissant à la fois le GFLV et l'ArMV ayant déjà été décrits (Nölke *et al.,* 2009). Toutefois, un premier criblage des 23 Nb anti-GFLV à ma disposition (voir chapitre 4), n'a pas permis d'identifier de Nb anti-GFLV susceptible de reconnaître les différents échantillons de vignes infectées par l'ArMV (résultats non montrés). C'est pourquoi la banque de 10^8 VHH issue de l'immunisation du dromadaire par le GFLV a été criblée une nouvelle fois par phage display, cette fois-ci contre des particules virales purifiées de l'isolat de référence de l'ArMV, l'ArMV-S. De ce criblage, sept clones de VHH anti-GFLV ont été isolés et séquencés, mettant en évidence deux séquences réellement divergentes au niveau des *Complementary Determining Regions* (CDR) (figure 5.1). Ces deux Nb, nommés Nb ArMV8 et ArMV70, ont été clonés en phase avec le peptide signal pelB ainsi qu'avec les étiquettes 6His et StrepTagII dans le vecteur d'expression bactérienne p0GwA

Famille	Nb #	Taille (kDa)
1	1068	15.06
	2008	15.13
	2010	14.99
	2041	15.09
	2080	14.82
	2168	14.97
	3043	15.09
	3058	15.03
	3066	15.17
2	2059	14.97
	2115	14.98
	2138	14.95
3	1009	15.22
4	2038	14.37
5	2035	14.93
	3052	14.88
	3063	14.9
6	1047	14.53
7	1077	15.26
8	1033	14.91
9	2086	15.05
10	1081	14.14
11	1079	14.24
12	2085	14.37
13	1092	14.26
14	1014	14.33
15	2078	14.28
16	1080	14.55
17	2074	14.66
18	3050	14.19
19	1025	14.29
	2022	14.32
	2037	14.23
	2053	14.37
	2069	14.3
	2079	14.29
	2097	14.09
	2103	14.35
	2107	14.3
	2108	14.28
	3082	14.24
20	3081	14.11
21	3008	14.45
22	2113	14.42
23	2120	14.85
24	2064	15.02
25	1073	14.77

Tableau 5.1. Les 47 Nb anti-ArMV obtenus après immunisation d'un lama ont été classés en 25 familles différentes sur la base de l'identité de séquence du CDR3. Les Nb d'une même famille reconnaissent généralement le même épitope mais avec des affinités potentiellement différentes, alors que deux Nb de familles différentes reconnaissent généralement deux épitopes différents. Les familles composées de plus d'un Nb sont surlignées par une couleur différentielle .

puis produits en bactéries BL21(DE3). Malheureusement, aucun de ces Nb purifiés ne s'est avéré capable de reconnaître l'ArMV-S ni d'ailleurs le GFLV-F13 en DAS-ELISA (résultats non montrés). Ces Nb ont été testés une nouvelle fois par *Periplasmic Extract*-ELISA (PE-ELISA) en utilisant les extraits périplasmiques des bactéries TG1 contenant les vecteurs Nb anti-ArMV initiaux ayant servi au phage display. Ces Nb produits dans le périplasme des bactéries n'ont pas conduit d'avantage à un signal positif en PE-ELISA contre de l'ArMV-S purifié. Nous avons donc entrepris de produire des Nb contre l'ArMV par la même approche que pour le GFLV. Pour cela, un lama (et non plus un dromadaire) a été immunisé avec de l'ArMV-S purifié à raison de 100 µg par injection et de six injections au total. Après *phage display*, 47 Nb anti-ArMV ont ainsi été isolés et séquencés par Baptiste Monsion au *VIB* de Bruxelles, dans l'équipe de Serge Muyldermans. L'analyse des CDR de ces 47 Nb a permis de les classer en 25 familles, présentées dans le tableau 5.1.

II. Caractérisation des Nb anti-ArMV

1. Sélection des Nb anti-ArMV d'intérêt par PE-DAS-ELISA

Compte tenu du grand nombre de Nb anti-ArMV identifié, il semblait difficile d'arriver à cloner, produire, purifier et cribler les 47 Nb, dans le temps imparti pour ma thèse. Afin d'identifier plus rapidement les Nb intéressants pour une utilisation en diagnostic ELISA, des PE-ELISA ont été réalisés en utilisant les extraits périplasmiques des bactéries TG1 exprimant les Nb anti-ArMV sans modification préalable. La présence de particules virales est détectée directement à partir des Nb contenus dans les extraits périplasmiques. Ces Nb portent le l'étiquette HA qui permet une révélation par un anticorps secondaire anti-HA couplé à la peroxydase de raifort. Les extraits périplasmiques contenant les différents Nb anti-ArMV en quantités variables ont d'abord été testés contre de l'ArMV-S purifié dilué dans du tampon PBS à 1 µg/ml afin s'assurer de leur reconnaissance de l'isolat de référence (tableau 5.2). Les résultats de ce PE-ELISA sont présentés sous la forme d'un rapport de la valeur d'absorbance obtenue en présence de l'ArMV-S sur celle d'un témoin négatif (tampon PBS 1X seul). Lorsque ce rapport est supérieur à 2, la détection de l'ArMV-S par le Nb correspondant est considérée comme étant positive. Les 47 Nb identifiés reconnaissent tous l'ArMV-S, la souche de référence ayant servi à l'immunisation. De grandes variations sont observées selon les échantillons, probablement en raison du niveau d'accumulation périplasmique et

Famille	Nb #	ArMV-S/ contrôle (-)
1	2041	18.27
	3058	13.67
	2008	11.62
	3066	9.13
	1068	8.62
	2168	7.66
	2010	5.09
	3043	5.02
	2080	4.10
2	2059	8.11
	2115	5.54
	2138	3.90
3	1009	4.37
4	2038	24.89
5	2035	6.90
	3052	5.93
	3063	4.24
6	1047	21.20
7	1077	4.10
8	1033	8.54
9	2086	8.78
10	1081	5.05
11	1079	2.53
12	2085	2.04
13	1092	5.01
14	1014	6.20
15	2078	2.16
16	1080	3.35
17	2074	3.63
18	3050	10.02
19	2079	7.90
	1025	7.72
	2097	6.52
	3082	6.36
	2037	6.12
	2053	5.31
	2108	5.26
	2069	3.87
	2103	3.85
	2107	3.01
	2022	2.25
20	3081	11.00
21	3008	4.39
22	2113	5.35
23	2120	5.88
24	2064	7.50
25	1073	23.59

Tableau 5.2. **Reconnaissance de l'ArMV-S par les 47 Nb analysée par PE-ELISA.** Les particules virales sont directement adsorbées dans les puits de la plaque ELISA. Les chiffres indiqués dans la troisième colonne correspondent au rapport des valeurs d'absorbance ($DO_{650\ nm}$) du signal obtenu pour l'ArMV-S dilué dans le tampon PBS sur celles du contrôle négatif (tampon PBS seul). Lorsque ce rapport virus/contrôle négatif est supérieur à 2, la détection de l'ArMV-S par le Nb correspondant est considérée comme positive. L'intensité des nuances de vert est proportionnelle à l'efficacité de reconnaissance de l'ArMV-S par les Nb.

de l'affinité des différents Nb. La capacité de reconnaissance de l'ArMV-S par les Nb est différente selon le Nb testé. Globalement, les neuf Nb de la famille 1 présentent de bons rapports d'absorbance ArMV/Témoin négatif, ce qui pourrait indiquer une bonne réactivité générale de ces Nb contre l'ArMV ; mais ce sont les Nb 2038 (famille 4), 1047 (famille 6) et 1073 (famille 25) qui présentent les meilleurs rapports signaux/bruit.

Afin d'identifier les Nb anti-ArMV les plus intéressants pour leur spectre, j'ai sélectionné six isolats différents d'ArMV de la collection de l'INRA de Colmar, dont la totalité est décrite tableau 5.3, selon deux critères : une détection efficace (absorbance élevée) par le kit ELISA anti-ArMV commercial (résultats non montrés) et des échantillons de cépages différents. Le PE-DAS-ELISA contre ces six isolats d'ArMV a été réalisé en utilisant les anticorps commerciaux Bioreba pour la capture des particules virales, et les extraits périplasmiques des bactéries TG1 contenant les différents Nb anti-ArMV pour la détection. La présence des Nb a été révélée grâce aux anticorps secondaires anti-HA couplés à la peroxydase de raifort. Les valeurs sont présentées sous la forme d'un rapport de l'absorbance obtenue pour l'échantillon de vigne infectée par rapport à l'échantillon de vigne saine (Tableau 5.4). L'absorbance mesurée pour les témoins sains était plus élevée que pour le test contre de l'ArMV-S (DO du témoin sain parfois supérieure à 0.25), et s'explique probablement par l'utilisation de broyat de feuilles de vignes contrairement au test précédent pour lequel le témoin sain était du tampon PBS. Ces témoins sains élevés contribuant à des rapports d'absorbance infecté/sain beaucoup plus faible que ceux mesurés pour le test précédent, j'ai donc intentionnellement abaissé le seuil de positivité à 1,75, pour permettre l'indentification d'un nombre plus large de Nb capables de détecter les échantillons testés et limiter l'élimination de Nb potentiellement intéressants.

L'analyse des résultats montre que la reconnaissance des différents isolats d'ArMV est variable d'un Nb à l'autre même à l'intérieur d'une même famille (c'est notamment le cas des Nb des familles 1 et 19). Certains Nb comme les Nb 1068, 2115, 1077 ou 1073 ne semblent reconnaître aucun des isolats d'ArMV testé alors qu'ils reconnaissent parfaitement l'ArMV-S, le Nb 1073 étant même parmi les plus performants contre cet isolat (figure 5.3 dernière colonne). Il est difficile de conclure avec certitude sur le spectre réel de ces Nb, même si les extraits périplasmiques contenant les Nb sont les mêmes que ceux ayant précédemment réagis contre l'ArMV-S. Néanmoins, cette analyse montre que les Nb 2010, 2168, 2059, 3052, 2086, 1081, 2074, 3050 et 3082 qui semblaient performants sur l'ArMV-S purifié permettent la détection des six isolats testés. Afin de sélectionner des Nb au large

Cépage	Numéro	Origine	Abréviation
Cabernet Franc	N37	*Colmar*	**CF N37**
Chardonnay	H98	*Colmar*	**Ch. H98**
Chardonnay	**B813**	***Colmar***	**Ch. B813**
Chardonnay	C1200	*Colmar*	**Ch. C12**
Chardonnay	**D7**	***Colmar***	**Ch. D7**
Chardonnay	D8	*Colmar*	**Ch. D8**
Chardonnay	H133	*Colmar*	**Ch. H133**
Chardonnay	**H138**	***Colmar***	**Ch. H138**
Chardonnay Lornet	T61	*Colmar*	**Ch. T61**
Chardonnay Lornet	T62	*Colmar*	**Ch. T62**
Chardonnay Lornet	T66	*Colmar*	**Ch. T66**
Chardonnay Lornet	T68	*Colmar*	**Ch. T68**
La Rousse	E1	*IFV*	**L.R E1**
Riesling	J86	*Colmar*	**R. J86**
Riesling	K77	*Colmar*	**R. K77**
Riesling	L3	*Colmar*	**R. L3**
Riesling	**L5**	***Colmar***	**R.L5**
Rupestris	E14	*IFV*	**R. E14**
Syrah	E81	*IFV*	**S. E81**
Tannat	N152	*Colmar*	**T. N152**
Ugni B	E211	*Colmar*	**Ub. E211**
Zirock	**P116**	***Colmar***	**Z. P116**
Zirock	P118	*Colmar*	**Z. P118**
Zirock	P119	*Colmar*	**Z. P119**
Zirock	P120	*Colmar*	**Z. P120**

Tableau 5.3 Liste des vignes infectées par différents isolats d'ArMV présentes dans les collections de l'INRA de Colmar et à de l'IFV, regroupant 25 échantillons. La colonne de droite indique les abréviations utilisées pour identifier les isolats d'ArMV dans de ce chapitre. Les isolats en bleu sont les isolats sélectionnés pour tester le spectre préliminaire des Nb anti-ArMV visant à sélectionner les Nb au spectre le plus large.

Famille	Nb #	CF N37	Ch. B813	Ch. D7	Ch. H138	R. L5	Z. P116	ArMV-S
1	1068	0.95	1.02	1.06	1.02	1.06	1.09	8.62
1	**2008**	2.12	2.45	1.18	1.82	2.47	3.17	11.62
1	**2010**	**2.37**	**2.31**	**2.40**	**2.06**	**2.24**	**3.00**	**5.09**
1	2041	1.17	1.85	1.09	1.04	1.42	1.63	18.27
1	2080	1.08	1.44	1.04	1.16	1.26	1.33	4.10
1	**2168**	**2.29**	**2.92**	**1.92**	**2.01**	**2.03**	**2.66**	**7.66**
1	3043	1.62	1.92	1.60	1.51	1.70	1.67	5.02
1	**3058**	2.48	3.39	1.52	1.79	2.58	3.46	13.67
1	3066	1.61	1.62	1.44	1.42	1.65	1.74	9.13
2	**2059**	**2.32**	**2.38**	**2.79**	**1.80**	**2.78**	**3.05**	8.11
2	2115	1.04	1.56	1.04	1.29	1.28	1.45	5.54
2	2138	1.41	0.94	1.16	0.67	1.52	1.86	3.90
3	1009	1.04	1.01	0.99	1.03	1.02	1.24	4.37
4	2038	1.63	2.36	1.69	1.64	1.84	2.08	24.89
5	2035	1.37	1.50	1.48	1.27	1.36	1.42	6.90
5	**3052**	**2.29**	**2.68**	**2.20**	**2.17**	**2.62**	**3.33**	5.93
5	3063	1.45	1.54	1.21	1.30	1.44	1.82	4.24
6	**1047**	1.51	1.75	1.85	1.29	1.92	2.30	21.20
7	1077	1.04	1.14	1.22	1.13	1.31	1.08	4.10
8	1033	1.65	1.72	2.14	1.57	1.93	2.40	8.54
9	**2086**	**2.27**	**3.16**	**2.14**	**2.27**	**2.39**	**3.17**	8.78
10	**1081**	**1.80**	**2.61**	**2.18**	**1.76**	**3.51**	**2.42**	5.05
11	1079	1.53	1.66	1.89	1.36	2.10	2.03	2.53
12	**2085**	2.25	1.83	2.40	1.52	2.00	2.64	2.04
13	1092	1.36	1.63	1.67	1.46	1.75	1.85	5.01
14	1014	1.50	1.65	1.81	1.42	1.72	2.01	6.20
15	2078	0.98	1.25	1.16	1.13	1.95	1.13	2.16
16	1080	1.49	1.60	1.65	1.35	1.94	1.92	3.35
17	**2074**	**2.06**	**2.80**	**1.87**	**2.08**	**2.06**	**2.93**	3.63
18	**3050**	**1.94**	**2.28**	**1.79**	**1.90**	**1.88**	**2.59**	10.02
19	1025	1.58	1.52	1.72	1.35	1.80	2.38	7.72
19	2022	0.91	1.00	0.96	1.03	1.14	1.20	2.25
19	2037	1.26	1.32	1.30	1.25	1.34	1.41	6.12
19	2053	1.30	1.29	1.44	1.19	1.27	1.88	5.31
19	2069	1.35	3.10	1.23	2.49	1.33	1.27	3.87
19	2079	1.15	1.19	1.04	1.00	1.07	1.17	7.90
19	**2097**	2.39	1.82	2.50	1.30	2.66	3.35	6.52
19	2103	1.00	1.12	1.14	0.76	1.45	1.27	3.85
19	**2107**	2.17	1.80	2.18	1.03	2.60	3.09	3.01
19	2108	1.09	1.06	1.18	0.68	1.24	1.09	5.26
19	**3082**	**2.44**	**2.92**	**2.50**	**2.38**	**3.04**	**3.59**	6.36
20	**3081**	1.82	2.20	1.79	1.72	2.18	2.34	11.00
21	3008	1.16	0.98	1.31	0.86	1.48	1.24	4.39
22	2113	1.50	1.57	1.71	0.90	1.74	1.90	5.35
23	2120	1.18	0.83	1.13	0.73	1.16	1.27	5.88
24	**2064**	1.98	1.77	1.78	1.55	2.01	2.81	7.50
25	1073	1.00	0.99	1.01	0.98	1.07	1.15	23.59

Tableau 5.4. PE-DAS-ELISA des 47 Nb anti-ArMV par contre six isolats d'ArMV de la collection de l'INRA de Colmar. Les chiffres correspondent au rapport des valeurs d'absorbance ($DO_{650\ nm}$) pour les échantillons infectés sur celles du témoin sain. Lorsque le rapport infecté/sain est supérieur à 1.75, la détection de l'isolat d'ArMV est considérée positive et est surlignée en vert. La dernière colonne correspond à la réactivité des extraits périplasmiques vis-à-vis de l'ArMV-S purifié décrite précédemment. En noir et en gras sont indiqués les Nb reconnaissant au moins 4 des 6 isolats testés.

Famille	Nb #	CF N37	Ch. B813	Ch. D7	Ch. H138	R. L5	Z. P116
1	**2008**	2.12	2.45	1.18	1.82	2.47	3.17
1	**2010**	2.37	2.31	2.40	2.06	2.24	3.00
1	**2168**	2.29	2.92	1.92	2.01	2.03	2.66
1	**3058**	2.48	3.39	1.52	1.79	2.58	3.46
2	**2059**	2.32	2.38	2.79	1.80	2.78	3.05
5	**3052**	2.29	2.68	2.20	2.17	2.62	3.33
6	**1047**	1.51	1.75	1.85	1.29	1.92	2.30
9	**2086**	2.27	3.16	2.14	2.27	2.39	3.17
10	**1081**	1.80	2.61	2.18	1.76	3.51	2.42
12	**2085**	2.25	1.83	2.40	1.52	2.00	2.64
17	**2074**	2.06	2.80	1.87	2.08	2.06	2.93
18	**3050**	1.94	2.28	1.79	1.90	1.88	2.59
19	**2097**	2.39	1.82	2.50	1.30	2.66	3.35
19	**2107**	2.17	1.80	2.18	1.03	2.60	3.09
19	**3082**	2.44	2.92	2.50	2.38	3.04	3.59
20	**3081**	1.82	2.20	1.79	1.72	2.18	2.34
24	**2064**	1.98	1.77	1.78	1.55	2.01	2.81

Tableau 5.5. Liste récapitulative des 17 Nb capables de reconnaître au mois 4 isolats d'ArMV sur les 6 testés en PE-DAS-ELISA. Les chiffres correspondent au rapport des absorbances (DO_{650nm}) obtenues pour l'échantillon infecté sur celui du témoin sain. La détection est considérée positive quand le rapport infecté/sain est supérieur à 1.75, surlignée en vert dans ce tableau.

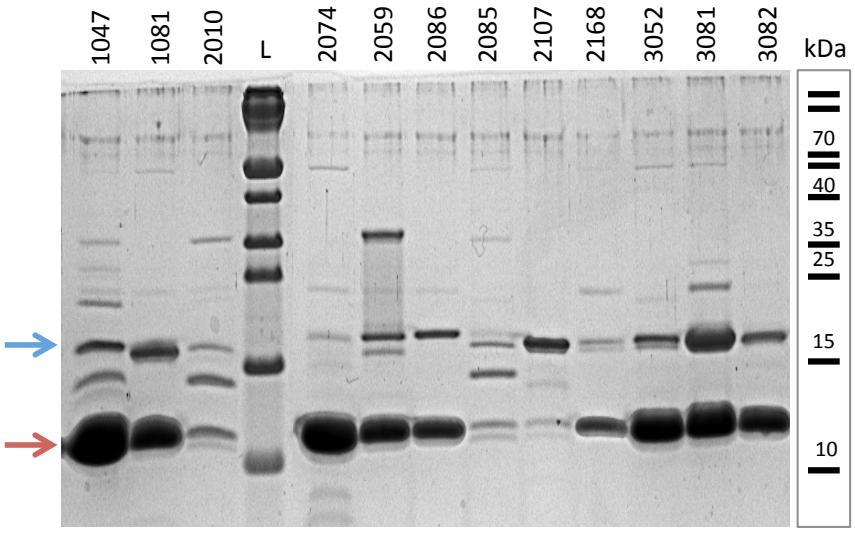


Figure 5.2. Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine de 12 Nb-6HisST anti-ArMV, après coloration des protéines au bleu de Coomassie. Les Nb-6HisST anti-ArMV ont été extraits du cytoplasme de bactéries SHuffle, purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap puis séparés par gel filtration. La taille attendue des Nb (de 16 à 17 kDa), est indiquée par une flèche bleue. La flèche rouge indique la position d'une protéine contaminante majeure. L= ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à droite de la figure.

spectre de différentes familles, j'ai complété cette première identification avec d'autres Nb capables de reconnaître au moins quatre des six isolats testés, représentant alors un total de 17 Nb potentiellement intéressants Tableau 5.5. Afin de limiter le nombre de Nb à caractériser, j'ai choisi d'éliminer les Nb 2008 et 3058 (famille 1) car ces deux Nb reconnaissent un isolat de moins que deux autres Nb de cette même famille (2010 et 2168), ainsi que le Nb 2097 (famille 19) appartenant à la même famille que les Nb 2107 et 3082. J'ai ainsi poursuivi la caractérisation de 14 Nb anti-ArMV.

2. Clonage et production de Nb anti-ArMV

Après la sélection des quatorze Nb anti-ArMV par criblage d'extraits périplasmiques des bactéries TG1 en PE-DAS-ELISA, une étiquette 6His-StrepTagII a été ajoutée à l'extrémité C-terminale de l'ensemble de ces Nb par PCR. Ces Nb ont été clonés en phase non pas avec la séquence pelB mais avec une méthionine en amont de la séquence du Nb, pour permettre leur expression cytoplasmique en bactéries SHuffle (Zarschler *et al.,* 2013) en pensant optimiser leur rendement de production. Ces Nb ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap puis par gel filtration, suivant le même protocole de purification que celui des Nb anti-GFLV. Les rendements de production des Nb-6HisST anti-ArMV sont très faibles (tous inférieurs à 0.1 mg/ml, résultats non montrés) et deux Nb (2064 et 3050) n'ont pu être produits selon cette méthode parce qu'aucun pic n'a été détecté à l'issue de la colonne d'affinité. Les différentes fractions obtenues ont été concentrées sur Centricon® (seuil d'exclusion de 5 kDa) à 1 mg/ml et analysées par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine et colorées au bleu de Coomassie (figure 5.2). Les Nb-6HisST anti-ArMV (flèche bleue figure 5.2) dont le poids moléculaire est d'environ de 16 kDa sont présents en quantités minoritaires et sont largement contaminés par d'autres protéines dans différentes proportions, notamment par une protéine d'environ 12 kDa (flèche rouge). La présence de ces nombreux contaminants est certainement liée aux nombreuses protéines cytoplasmiques, jusqu'à dix fois plus abondantes que dans le périplasme (Quan, 2013) et par le fait que certaines protéines cytoplasmiques d'*E. coli* peuvent avoir une affinité modérée pour les ions Ni^{2+} présents sur les billes de la colonne HisTrap (Lindner et al., 1992). Malgré les faibles quantités de Nb disponibles et de pureté non homogène, ces Nb anti-ArMV ont quand même été testés en tant qu'anticorps de détection contre la collection de vignes infectées par l'ArMV de l'INRA de Colmar et de l'IFV.

(A)

		Famille									
		1		2	5	6	9	10	19		20
Échantillon	Bioreba	2010	2168	2059	3052	1047	2086	1081	2107	3082	3081
ArMV-S											
ArMV-T											
Ch. B813											
Ch. C12											
Ch. D7											
Ch. D8											
Ch. H133											
Ch. H138											
Ch. H98											
Ch. T61											
Ch. T62											
Ch. T66											
Ch. T68											
L.R E1											
R. E14											
R. J86											
R. L3											
R. L5											
S. E81											
T. N152											
Z. P116											
Z. P116 N											
Z. P118											
Z. P119											
Z. P120											

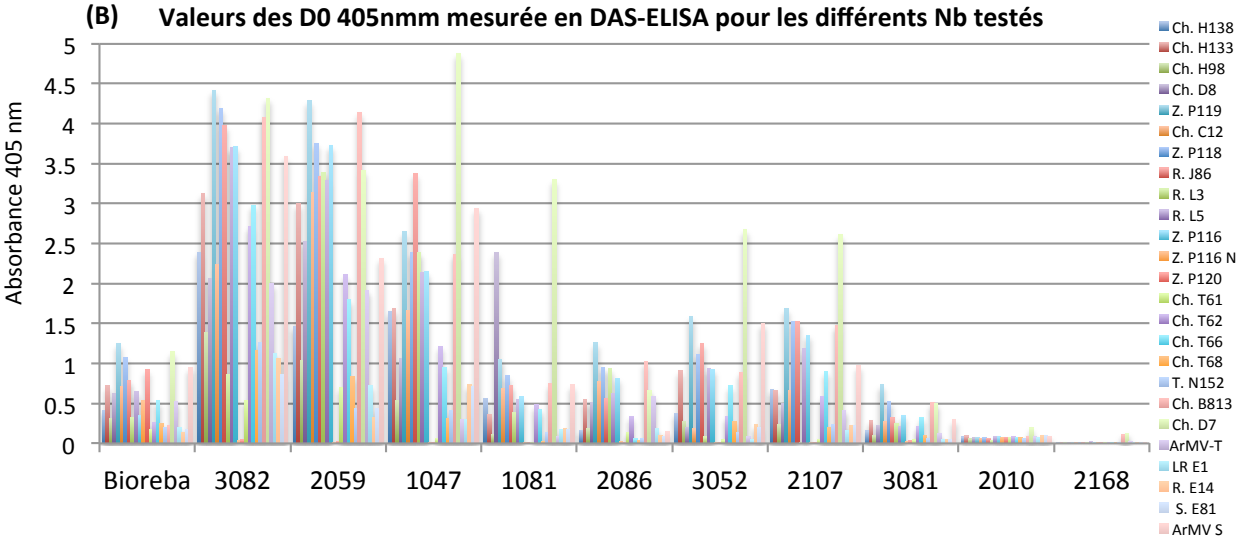


Figure 5.3. **Spectre de reconnaissance des différents Nb-6HisST testés contre 25 isolats d'ArMV. (A)** 10 Nb-6HisST produits et purifiés à partir de bactéries SHuffle ont été utilisés comme réactifs de détection en DAS-ELISA hybride contre différents isolats d'ArMV issus des collections de vignes infectées de l'INRA de Colmar et de l'IFV. Un rectangle vert indique une détection de l'isolat d'ArMV par le Nb-6HisST correspondant. Un rectangle rouge signifie l'absence de détection de l'isolat par le Nb correspondant. La colonne dénommé Bioreba fait référence au kit anti-ArMV commercial. **(B)** Le graphique indique les valeurs d'absorbances mesurées pour chacun des 10 Nb-6HisST utilisés pour détecter les 25 isolats d'ArMV en DAS-ELISA, comparé au kit commercial Bioreba.

3. Caractérisation des Nb-anti ArMV

La première caractérisation du spectre des Nb anti-ArMV a donc été réalisée à l'aide des Nb produits en bactéries SHuffle, c'est à dire avec des Nb non purifiés à homogénéité, contre 25 isolats d'ArMV. L'évaluation du spectre a été réalisée selon le protocole hybride décrit figure 4.5, pour lequel la capture des particules virales d'ArMV est réalisée par les anticorps de coating polyclonaux anti-ArMV Bioreba et la détection par les Nb-6HisST anti-ArMV dilués au 1:500. Les Nb 1047-6HisST, 1081-6HisST, 2059-6HisST, 2086-6HisST, 3052-6HisST, 3082-6HisST reconnaissent au moins 23 isolats d'ArMV sur les 25 analysés (figure 5.3) mais ne permettent pas de couvrir le spectre complet du kit commercial Bioreba. Les Nb 2010-6HisST et 2168-6HisST présentent les spectres les plus restreints. Deux Nb-6HisST (2074 et 2085) n'ont pas pu être testés en raison de leur trop faible rendement de production, incompatible avec l'analyse de 25 échantillons.

Contrairement aux résultats obtenus avec les Nb GFLV, le spectre de reconnaissance de plusieurs Nb (1047, 1081, 2059, 2086 et 3052) de familles différentes semble comparable. Ceci pourrait s'expliquer par la pré-sélection de ces Nb réalisée par PE-DAS-ELISA visant à identifier les Nb au spectre le plus large. Il apparaît que le Nb 3082 semble le plus performant, car il permet la reconnaissance du plus grand nombre d'échantillon (24/25) et est le seul Nb à permettre la reconnaissance de l'isolat Z. P120. L'isolat Z. P116 N n'est reconnu par aucun Nb. Cet échantillon est issu d'une bouture de l'isolat Z. P116 (reconnu par l'ensemble des Nb testé hormis le Nb 2168) réalisée deux ans avant les prélèvements réalisés pour ce test. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la répartition du virus dans un cep de vigne n'étant pas homogène, le bouturage a pu conduire à l'isolement d'un variant dans la nouvelle accession de Z. P116, non reconnu par les Nb.

Contrairement aux résultats observés pour les Nb anti-GFLV, la combinaison de plusieurs Nb ne permet a priori pas de reconnaitre l'ensemble des isolats d'ArMV de la collection de l'INRA de Colmar. Contrairement aux résultats du PE-ELISA réalisé contre l'ArMV-S purifié (tableau 5.2), les Nb-6HisST appartenant à la famille 1 semblent avoir une réactivité relativement faible contre les différents isolats d'ArMV testés. Il faut toutefois noter que si l'évaluation du spectre des Nb anti-ArMV purifiés a été possible, la comparaison des signaux (absorbance) entre les différents Nb est délicate, du fait des différentes proportions de protéines contaminantes pour chaque Nb. Il apparaît néanmoins que le signal mesuré pour les Nb 3082-6HisST, 2059-6HisST et 1047-6HisST est globalement nettement supérieur à celui obtenu avec les autres Nb, en particuliers les Nb 2010-6HisST et 2168-6HisST, mais

Famille	Nb	Z. P116 N	Z. P120
1	1068	1.103	1.242
1	2008	1.155	1.368
1	2041	0.859	0.954
1	2080	1.239	1.410
1	3043	1.350	1.403
1	3058	1.002	1.118
1	3066	1.115	1.257
2	2115	3.820	1.671
2	2138	2.631	2.455
3	1009	1.138	1.217
4	2038	0.926	1.274
5	2035	2.167	1.612
5	3063	1.924	1.618
7	1077	1.048	1.305
8	1033	1.473	1.551
9	2086	1.468	1.446
11	1079	1.324	1.549
12	2085	1.110	1.325
13	1092	1.146	1.297
14	1014	1.323	1.497
15	2078	1.418	1.600
16	1080	1.179	1.390
17	2074	1.101	1.256
18	3050	1.162	1.480
19	1025	0.989	1.061
19	2022	1.000	1.107
19	2037	1.590	1.525
19	2053	1.050	1.131
19	2069	2.117	1.852
19	2079	0.942	1.088
19	2097	1.641	1.619
19	2103	2.755	2.402
19	2108	1.269	1.416
21	3008	1.614	1.669
22	2113	1.570	1.786
23	2120	1.500	1.253
24	2064	0.969	1.247
25	1073	0.914	1.176

Tableau 5.6. **Recherche de Nb permettant la détection des isolats Z. P116 N et Z. P120** provenant de la collection de vignes infectées de l'INRA de Colmar par PE-DAS-ELISA. Les nombres indiqués correspondent au rapport des valeurs d'absorbance ($DO_{650\ nm}$) du signal mesuré pour les échantillons infectés sur celles du témoin sain. Lorsque ce rapport infecté/ sain est supérieur à 2, le test est considéré comme étant positif et l'échantillon détecté. Les échantillons détectés sont représentés ici par un rectangle vert.

aussi avec le test Bioreba (graphique figure 5.3). Ces 3 Nb pourraient par conséquent être des candidats intéressants pour le développement d'un test composé uniquement de Nb, bien que reconnaissant a priori pas ou peu les isolats Z. P116 N et Z. P120. Afin de palier cette absence de couverture totale du spectre du kit commercial, j'ai procédé à un nouveau criblage de la collection des 37 autres Nb anti-ArMV contre les isolats Z. P116 N et Z. P120.

4. Recherche de Nb anti-ArMV capables de détecter les isolats Z. P116 N et Z. P120 par PE-DAS-ELISA

Compte tenu du faible rapport signal sur bruit obtenu pour les échantillons vignes, il était difficile de savoir si la non reconnaissance des isolats Z. P116 N et Z. P120 étaient due à l'absence de reconnaissance du virus par les Nb, à la faible affinité des Nb pour ces variants ou encore à la présence de protéines contaminantes en proportions importantes. Un deuxième criblage des extraits périplasmiques des 37 autres Nb anti-ArMV a donc été réalisé sur ces 2 isolats selon le même protocole de PE-DAS-ELISA que celui décrit chapitre 5 paragraphe II.4. Les résultats de ce PE-DAS-ELISA sont présentés dans la Tableau 5.6. Comme précédemment, les rapports infecté/sain mesurés sont globalement faibles, mais j'ai néanmoins considéré le test comme étant positif lorsque ce rapport était supérieur à 2. Cinq Nb de trois familles différentes répondent à ce critère à savoir les Nb 2035, 2069, 2103, 2115 et 2138 qui reconnaissent tous l'isolat Z. P116 N, alors que l'isolat Z. P120 n'est reconnu que par les Nb 2138 et 2103. Forte de ces résultats, la reconnaissance de l'ensemble des échantillons ArMV de nos collections était à présent envisageable en combinant l'un des Nb 1047, 2059 ou 3082 avec l'un des Nb 2035, 2069, 2103, 2115 et 2138. Ces Nb ont donc été clonés en phase avec une étiquette 6His-StrepTagII C-terminale en vecteur d'expression p0Gwa pour permettre leur production en bactérie et leur purification par chromatographie d'affinité et gel filtration.

5. Optimisation de la purification des Nb anti-ArMV

L'expression et la purification des Nb anti-ArMV à partir des bactéries SHuffle n'étant pas vraiment satisfaisante (figure 5.2), j'ai cherché à améliorer leur production et leur purification. Pour cela, le Nb 3082-6HisST a été produit soit en bactéries BL21 (pelB Nb 3082-6HisST), soit en bactéries SHuffle (Nb 3082-6HisSTc). Après extraction et purification par

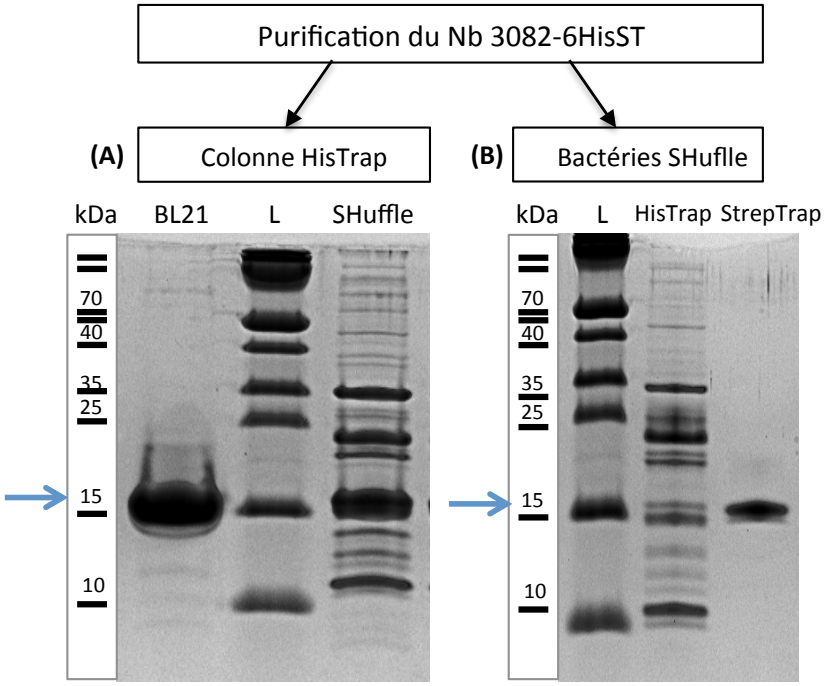


Figure 5.4. (A) Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine de fractions périplasmiques ou cytoplasmiques du Nb 3082-6HisST purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap, respectivement issues de la production de ce Nb en bactéries BL21 ou SHuffle. **(B) Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine de fractions cytoplasmiques du Nb 3082-6HisST** produit en bactéries SHuflle et purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap puis StrepTrap. La taille attendue du Nb 3082-6HisST est de 16,12 kDa, indiquée par une flèche bleue. L=ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche de chaque gel.

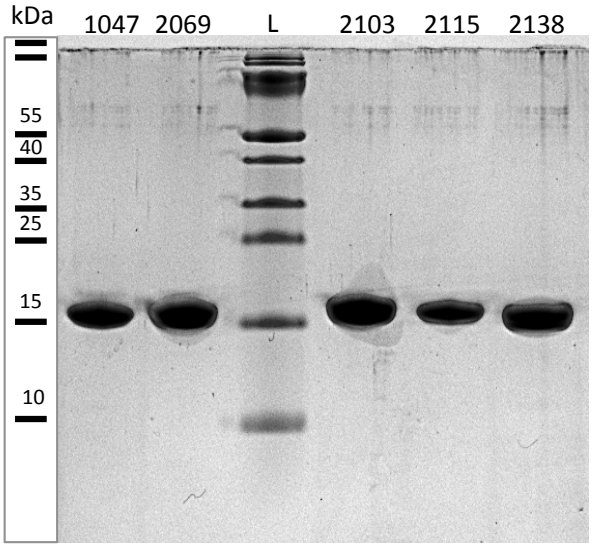


Figure 5.5. Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine de la purification de cinq Nb-6HisST après une production périplasmique en bactéries BL21 suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap. L=ladder; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche du gel.

chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap, j'ai analysé les fractions d'élution de cette colonne par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine après coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 5.4.A), il apparaît immédiatement que la production périplasmique conduit à une purification plus homogène des Nb que la production cytoplasmique. En effet, une seule bande de masse moléculaire attendue (16 kDa, indiquée par une flèche bleue) est observée avec le Nb3082-6HisST produits en bactéries BL21, contrairement au Nb3082-6HisST produits en bactéries SHuffle, qui montre une forte proportion de protéines contaminantes.

Une étape de purification par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap est donc suffisante pour les Nb-6HisST produits dans le périplasme, mais pas pour ceux produits dans le cytoplasme. Comme les Nb-6HisST portent deux étiquettes (6His et StrepTag), il était donc possible d'améliorer la purification des Nb-6HisSTc par chromatographie d'affinité sur colonne StrepTrap. J'ai donc poursuivi la purification du Nb 3082-6HisSTc en injectant l'éluât de la colonne d'affinité HisTrap sur colonne StrepTrap. Le Nb 3082-6HisSTc a élué en présence de desthiobiotine puis analysé sur gel dénaturant Tris-Tricine après coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 5.4.B). Cette seconde chromatographie d'affinité sur colonne StrepTrap permet d'augmenter considérablement l'homogénéité de la purification, et permet d'éliminer la majorité, voire la totalité, des protéines contaminantes. Les deux méthodes (expression cytoplasmique avec deux étapes de chromatographie ou expression périplasmique avec une seule étape de chromatographie d'affinité) permettent donc l'obtention de Nb purifiés à quasi homogénéité. Cependant, compte tenu de la facilité de production, de purification et des rendement de purification dix fois plus élevés pour le Nb 3082 produit dans le périplasme que dans le cytoplasme (4 mg/L contre 0.4 mg/L), j'ai choisi l'expression périplasmique des protéines pour produire les sept autres Nb-6HisST (1047, 2035, 2059, 2069, 2103, 2115 et 2138). Après production en bactéries BL21, purification par chromatographie d'affinité et gel filtration, les différents Nb-6HisST ont été concentrés sur Centricon® (seuil d'exclusion 5 kDa) à 0.5 mg/ml puis analysés par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine et colorés au bleu de Coomassie (figure 5.5). En utilisant cette approche, l'ensemble des Nb est purifié à homogénéité, une protéine majoritaire de masse moléculaire attendue (environ 16 kDa) étant présente pour chaque Nb. Les Nb 2035-6HisST et 2059-6HisST n'ont pas pu être produits selon cette méthode pour des raisons que j'ignore à ce stade et que je n'ai pas cherché à approfondir faute de temps.

		Famille					
		2		6	19		
Échantillon	Bioreba	2115	2138	1047	2069	2103	3082
ArMV-S							
CF N37							
Ch. B813							
Ch. C12							
Ch. D7							
Ch. D8							
Ch. H133							
Ch. H138							
Ch. T62							
Ch. T66							
Ch. T68							
R. L3							
R. L5							
T. N152							
Z. P116 N							
Z. P118							
Z. P119							
Z. P120							

Tableau 5.7. **Spectre de reconnaissance de six différents Nb-6HisST purifiés à homogénéité** testés contre 18 isolats d'ArMV provenant de la collection de l'INRA de Colmar. Les rectangles verts indiquent une détection de l'isolat d'ArMV et les rectangles rouges l'absence de détection de l'isolat correspondant. La colonne Bioreba fait référence au kit DAS-ELISA anti-ArMV commercial.

6. Caractérisation des Nb anti-ArMV purifiés à homogénéité

Après production et purification à homogénéité, les six Nb-6HisST anti-ArMV ont été testés contre 18 isolats d'ArMV provenant de feuilles de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar selon le protocole hybride décrit figure 4.5, où la capture des particules virales est réalisée à l'aide des anticorps polyclonaux anti-ArMV commerciaux Bioreba et la détection par les Nb-6HisST dilués au 1:200. Les Nb 2069, 2103, 2115 et 2138, initialement identifiés par PE-DAS-ELISA contre les échantillons Z. P116 N et P120 (chapitre 5 paragraphe II.4), sont tous capables de détecter ces deux isolats, ainsi que la majorité des isolats testés, à l'exception des isolats Ch. T 68 et T. N152 pour le Nb 2115-6HisST et de l'isolat R. L3 pour les Nb 2069-6HisST et 2103-6HisST (tableau 5.7). Le Nb 2138, tout comme le 1047 et le 3082 sont remarquables car ces Nb sont tous trois capables de détecter l'ensemble des 18 isolats d'ArMV testés, et constituent donc des candidats très intéressants pour développer des réactifs de diagnostic ELISA anti-ArMV.

Curieusement, les Nb 3082 et 1047 issus de la production en BL21 sont capables de détecter l'ensemble des échantillons testés, ce qui est en contradiction avec les résultats précédents obtenus avec les mêmes Nb produits en bactéries SHuffle et avec lesquels les isolats Z. P120 et Z. P116N n'avaient pas été détectés. Ceci pourrait s'expliquer par une faible affinité de ces Nb pour ces deux isolats, non détectés au premier criblage probablement à cause de nombreuses protéines contaminantes présentes. Comme déjà observé pour les Nb anti-GFLV (chapitre 4, paragraphe V), les différences de détection pourraient également s'expliquer par des titres en virus irréguliers au cours des saisons et une répartition non homogène du virus dans les ceps infectés. En effet, les titres viraux peuvent considérablement fluctuer au cours du cycle végétatif de la vigne, des conditions climatiques et aussi des organes de la vigne (Krebelj *et al.,* 2015), d'où, l'importance de l'échantillonnage et la nécessité de reproduire les tests. En conclusion, trois Nb-6HisST (1047, 2138 et 3082) sont capables de détecter l'ensemble des variants ArMV testés et couvrent le spectre des isolats détectés par le kit commercial Bioreba anti-ArMV, provenant de la collection de l'INRA de Colmar.

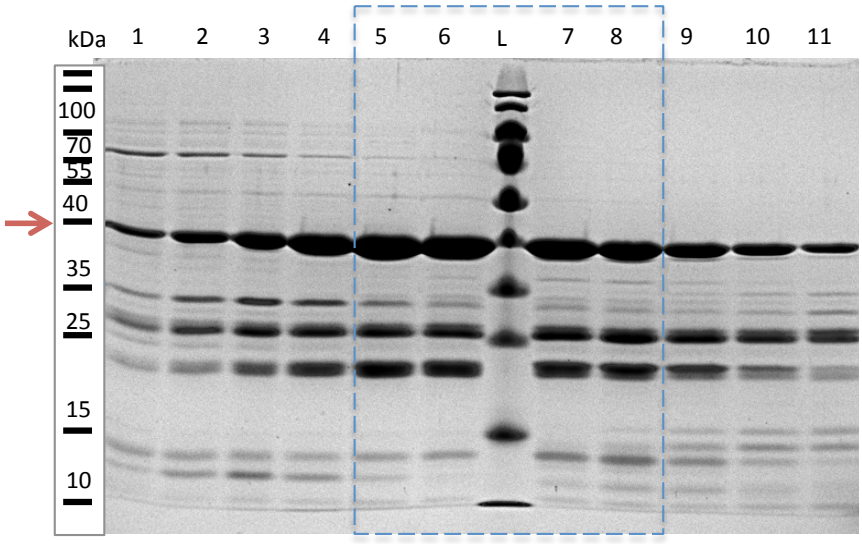


Figure 5.6. Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine des fractions d'élution collectées après gel filtration du Nb 2138-TR, après coloration des protéines au bleu de Coomassie. La position de la protéine de fusion (Cb) est indiquée par une flèche rouge. La pureté des fractions étant variable, les fractions ont été rassemblées selon leur proportion de contaminants puis concentrées à 1 mg/ml. L=ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa à gauche du gel.

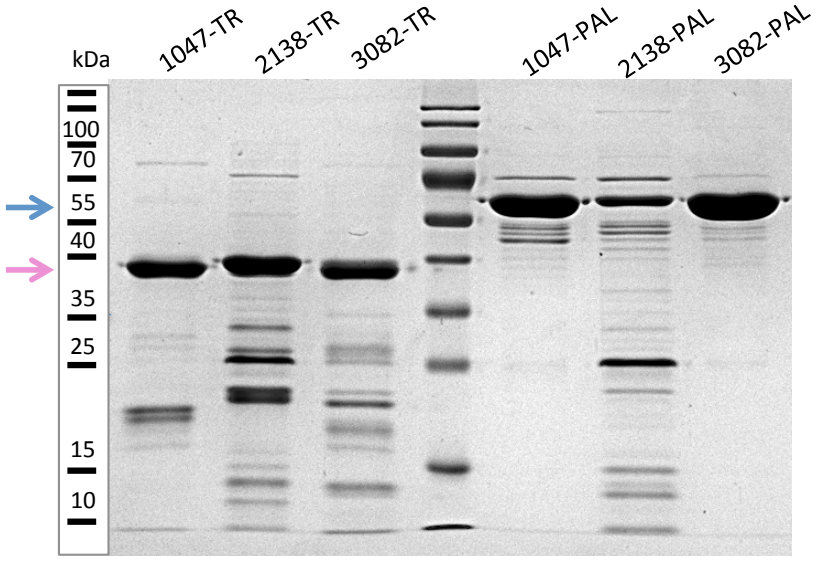


Figure 5.7. Analyse par électrophorèse sur gel dénaturant Tris-Tricine des purifications finales des Nb-TR et des Nb-PAL, après coloration des protéines au bleu de Coomassie. La flèche rose indique la taille attendue des Nb-TR et la flèche bleue celle des Nb-PAL. L = ladder ; les poids moléculaires sont indiqués en kDa entre les deux gels.

III. Développement des réactifs DAS-ELISA Nb anti-ArMV

Forts des résultats obtenus pour le développement de réactif de coating et de détection des Nb anti-GFLV, les réactifs Nb anti-ArMV ont été développés suivant le même principe.

Les séquences des trois Nb détectant le plus d'isolats d'ArMV (1047, 2138 et 3082) ont ainsi été clonées en vecteur d'expression pet22b(+) pour permettre leur fusion à la TagRFP et à la PAL. Les protéines de fusion ont été produites respectivement en bactéries SHuffle et BL21 puis purifiées par chromatographie d'affinité et gel filtration. Comme pour les Cb anti-GFLV, la pureté des fractions obtenues après gel filtration des Cb anti-ArMV étant variable, les fractions ont été rassemblées selon leur proportion de contaminants (figure 5.6). Les protéines de fusion ont ensuite été concentrées sur Centricon® (seuil d'exclusion 20 kDa) à 1 mg/ml, puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant pour vérification (figure 5.7). Dans tous les cas, les protéines de tailles attendues (environ 42 kDa) pour les Cb sont détectées. Il apparaît néanmoins que le Cb 1047-TR est le Cb contenant le moins de protéines contaminantes alors qu'elles sont légèrement plus abondantes dans pour les Cb 2138-TR et 3082-TR. Pour les Nb-PAL, les Nb 1047-PAL et 3082-PAL ont été purifiés à quasi-homogénéité, alors que le Nb 2138-PAL présente de nombreuses protéines contaminantes. La présence de ces protéines contaminantes peut perturber la reconnaissance des isolats d'ArMV par ce Nb et/ou augmenter le bruit de fond du test DAS-ELISA. Bien que le Nb 2138-PAL n'ait pas été purifié à homogénéité, j'ai quand même évalué la capacité des trois Nb-PAL à reconnaître différents isolats d'ArMV grâce au test hybride décrit figure 4.5. Les particules virales ont été capturées grâce aux anticorps anti-ArMV polyclonaux commerciaux (Bioreba), puis détectées avec l'un des Nb-PAL. J'ai ainsi analysé 19 isolats d'ArMV provenant de feuilles de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar et comparé les résultats du test Nb hybride à ceux du test commercial Bioreba anti-ArMV.

De manière remarquable, chacun des trois Nb-PAL (1047, 2138 et 3082) permet la détection de tous les isolats d'ArMV testés, et présente des absorbances nettement plus élevées que celles du kit Bioreba (figure 5.8). Chaque Nb-PAL présente une capacité de reconnaissance des isolats d'ArMV qui lui est propre. Les Nb 1047 et 3082 présentent des intensités de signal comparables pour les différents isolats à l'exception des isolats Z. P120 (mieux reconnu par le Nb 3082) et R. L3 (mieux reconnu par l'échantillon 1047). Ces deux Nb-PAL présentent globalement des absorbances supérieures à celles du Nb 2138-PAL à l'exception

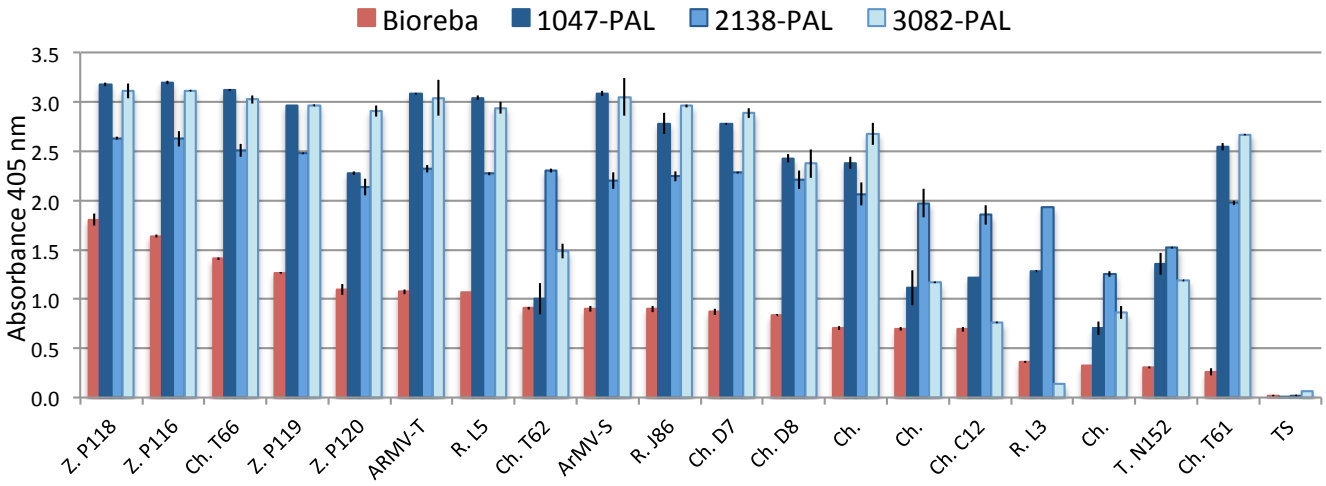


Figure 5.8. Analyse du spectre de reconnaissance des Nb-PAL anti-ArMV 1047, 2138 et 3082 contre 19 isolats d'ArMV provenant de la collection de vignes infectées de l'INRA de Colmar, comparé à celui du kit commercial anti-ArMV Bioreba. Le spectre des Nb est évalué grâce à un protocole hybride, pour lequel la capture des particules virales est réalisée grâce aux anticorps polyclonaux commerciaux Bioreba et la détection par chacun des Nb-PAL.

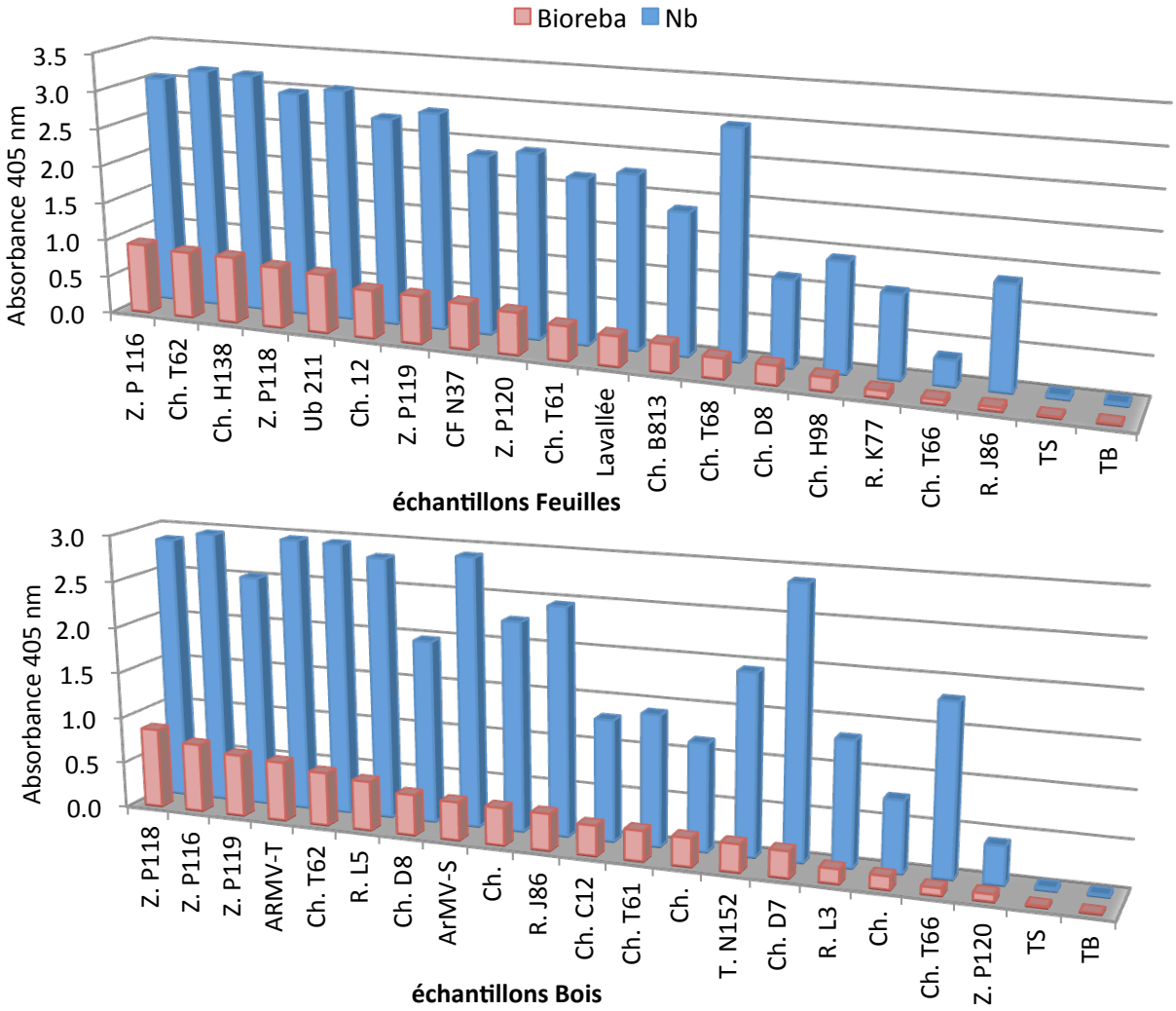


Figure 5.9. Spectre et efficacité de reconnaissance du test complet Nb anti-ArMV contre différents isolats d'ArMV provenant de feuilles ou de bois de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar, comparé au kit commercial anti-ArMV Bioreba.

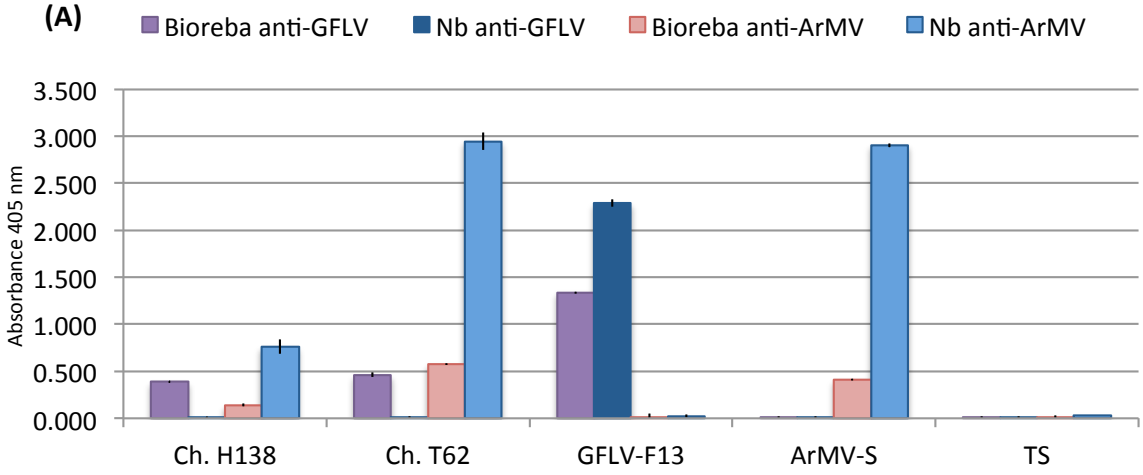
des isolats Ch. T62, Ch. H133, Ch. C12 et R. L3, mieux reconnus par le Nb 2138-PAL. En conclusion, les trois Nb 1047, 3082 et 2138 fusionnés à la PAL permettent une couverture complète du spectre de reconnaissance du kit DAS-ELISA anti-ArMV commercial, comme précédemment observé avec les Nb-6HisST (tableau 5.7).

IV. Évaluation du test complet Nb anti-ArMV

Après avoir validé l'utilisation des Nb-PAL comme réactifs de détection et avoir vérifié leur spectre contre différents isolats d'ArMV, le test complet, composé des Nb anti-ArMV 1047 et 2138 a été évalué contre 19 échantillons feuilles et 18 échantillons bois de la collection de l'INRA de Colmar, représentant un total de 25 isolats différents d'ArMV. Le Nb 3082 a quant à lui fait l'objet d'une analyse spécifique qui fait l'objet du paragraphe VI décrit ci-après.

Le test Nb anti-ArMV est composé des Cb 2138-TR et 1047-TR dilués au 1:1000 comme réactif de coating et des Nb 2138-PAL dilués au 1:10 000 et des Nb 1047-PAL dilués au 1:20 000. Ce test a été comparé au kit anti-ArMV commercial Bioreba (figure 5.9). Les tampons conjugués et les tampons substrats utilisés pour le test Nb anti-ArMV sont ceux décrits au chapitre 4 paragraphe IV, optimisés pour l'utilisation des réactifs Nb. Afin de pouvoir comparer les deux tests, j'ai pris la précaution de les faire simultanément dans les mêmes conditions expérimentales, en respectant le protocole commercial pour le kit Bioreba, à l'exception du volume de dépôt des anticorps (100 µl au lieu de 200 µl) et le protocole IFV/INRA pour les Nb. De manière remarquable, la totalité des échantillons testés sont positifs et les valeurs d'absorbance mesurées avec le test Nb sont toutes supérieures à celles du test Bioreba et ce, aussi bien pour les échantillons feuilles que bois. En moyenne, l'absorbance est 6.5 fois supérieure pour les échantillons feuilles et 6.8 fois pour les échantillons bois à celle mesurée pour le test Bioreba (évalué par le test de Student p-value <0,001). Concernant la valeur d'absorbance des témoins sains, représentée sur le graphique comme une moyenne des valeurs d'absorbance de trois échantillons sains, elle est deux fois plus élevée que celle du kit Bioreba pour les échantillons feuilles (0.031 +/- 0.005 pour le test Nb contre 0.015 +/- 0.002 pour Bioreba, différence évaluée par le test de Student p-value <0,001) et trois fois plus élevée pour les échantillons bois (0.033 +/- 0.09 pour le test Nb contre 0.013 +/- 0.006 pour le test Bioreba différence évaluée par le test de Student p-value <0,001), montrant une nouvelle fois un bruit de fond légèrement plus important pour le test

(A)



(B)

	DAS-ELISA					
	Réactifs Bioreba		**Réactifs Nb**		**Alignement des acides aminés de la CP (% d'identité a.a)**	**Recherche par BLAST (% d'identité a.a)**
	Anti-GFLV	Anti-ArMV	Anti-GFLV	Anti-ArMV		
Ch. H138	Positif ++	Positif +	Négatif	Positif ++	**96% ArMV-S** 83 % GFLV-F13	90 - 96 % ArMV 69 -70% GFLV
Ch. T62	Positif ++	Positif ++	Négatif	Positif +++	**97% ArMV-S** 89 % GFLV-F13	88 – 97 % ArMV 76 - 79% GFLV
ArMV-S	Négatif	Positif	Négatif	Positif	82% GFLV-F13	87 - 100 % ArMV 69 – 70 % GFLV
GFLV-F13	Positif	Négatif	Positif	Négatif	82% ArMV-S	95 – 100 % GFLV 67 - 70 % ArMV

Figure 5.10. (A) Analyse de la reconnaissance de deux isolats d'ArMV (Ch. H138 et Ch. T62) par les kits commerciaux Bioreba anti-GFLV et anti-ArMV ainsi que par les DAS-ELISA Nb anti-ArMV et anti-GFLV. **(B)** Analyse des séquences protéiques de la CP de ces deux isolats et comparaison avec des isolats d'ArMV et de GFLV caractérisés. a.a = acides aminés.

Nb. Ce test Nb anti-ArMV a été évalué contre 33 isolats de GFLV et ne permet la détection d'aucun isolat testé (résultats non montrés), démontrant la spécificité du test.

Afin de vérifier la reproductibilité et la répétabilité de ces résultats, des expériences complémentaires devront être menés par l'IFV et Bioreba. La plus faible quantité d'isolats d'ArMV disponibles (seulement trois isolats différents à l'IFV et une dizaine chez Bioreba) comparé au nombre d'isolats différents de GFLV sera surement un facteur limitant de ces tests. Le seuil de détection du test complet Nb devra également être déterminé et comparé à celui du kit commercial Bioreba anti-ArMV. Bien que devant être répétés et optimisés, ces résultats suggèrent encore une fois la supériorité des réactifs Nb comparé aux anticorps conventionnels.

V. Caractérisation des isolats Chardonnay H138 et T62

Lors des tests visant à comparer les DAS-ELISA commerciaux et les tests Nb, deux isolats (Ch. H138 et Ch. T62), ont été détectés de manière différentielle par les tests commerciaux Bioreba et Nb. De manière surprenante, d'une part, ces deux échantillons ont été diagnostiqués positifs par les kits DAS-ELISA commerciaux Bioreba anti-GFLV et anti-ArMV (figure 5.10.A) et d'autre part, ils ont été diagnostiqués positifs par le test complet Nb anti-ArMV (décrit au chapitre 5 paragraphe IV) mais négatifs avec le test complet Nb anti-GFLV (décrit au chapitre 4 paragraphe V). Afin de vérifier la co-infection présumée de ces échantillons, le gène codant pour la protéine de capside de ces deux isolats a été partiellement ou totalement séquencé (l'alignement des séquences est disponible en annexe 4). Les séquences obtenues n'ont pas révélé la présence d'une co-infection, mais d'un seul isolat viral sur la base de l'annotation qualitative des chromatogrammes. Les séquences ont été alignées avec les isolats de référence GFLV-F13 et ArMV-S, montrant une plus forte identité de séquence protéique pour l'ArMV-S (96% d'identité pour l'isolat Ch. H138 et 97% pour l'isolat Ch. T62 ; figure 5.10.B). Ces deux isolats montrent une identité de séquence protéique avec le GFLV-F13 comparable à celle observée entre l'ArMV-S et le GFLV-F13. Ces deux résultats indiquant que les isolats Ch. H138 et Ch. T62 étaient plus proche de l'ArMV, les séquences obtenues ensuite été soumises au programme BLAST (*Basic Local Alignement Search Tool*) afin de trouver des séquences similaires correspondant à des protéines de capside de virus séquencés référencés. Il s'avère que ces deux isolats présentent de 90 à 96 % d'identité de séquence protéique avec la protéine de capside d'isolats d'ArMV connus et

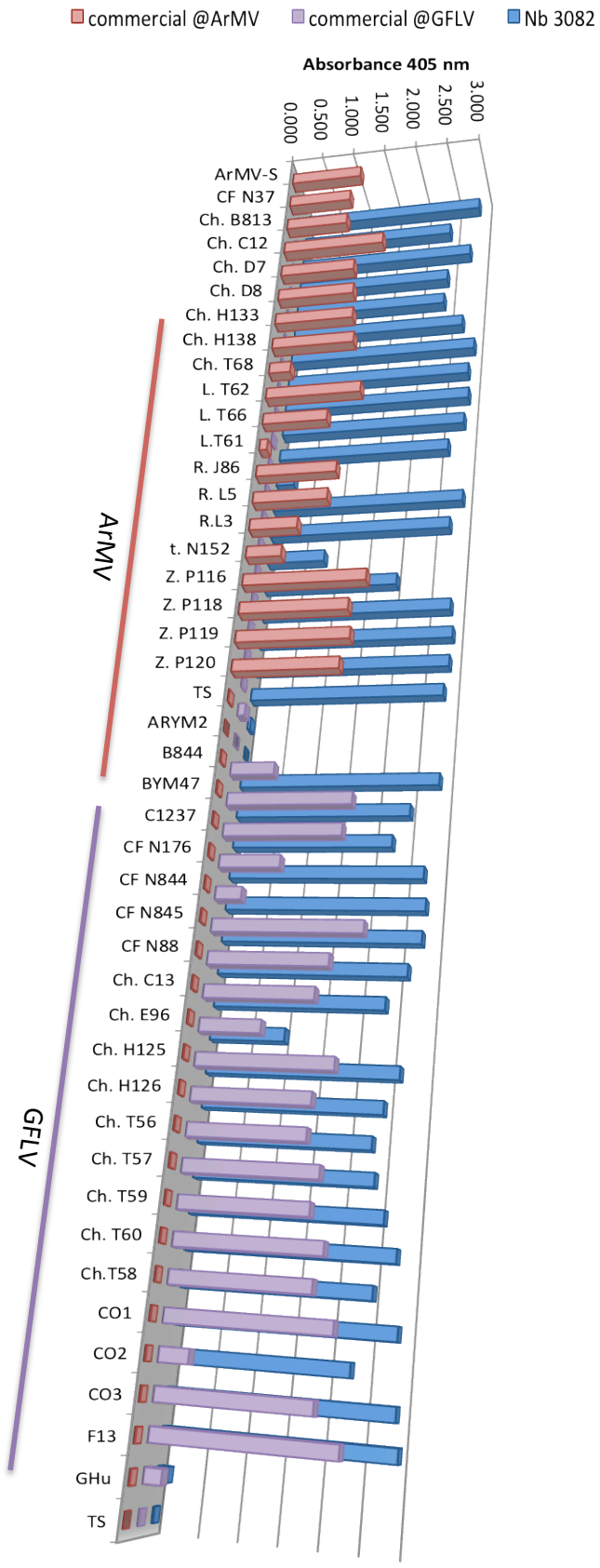


Figure 5.11. DAS-ELISA Nb 3082-ST hybride (en bleu) comparé au test DAS-ELISA commercial anti-GFLV (en violet) et anti-ArMV (en rouge) contre des échantillons de vignes infectées par l'ArMV ou par le GFLV provenant de la collection de l'INRA de Colmar.

moins de 80 % avec celles de GFLV référencées (figure 5.10.B), indiquant l'appartenance de ces deux isolats à l'espèce virale ArMV. Il semble donc que la spécificité et la sensibilité du test Nb soient meilleures que celle du test Bioreba montrant une nouvelle fois la supériorité des tests Nb par rapport aux kit DAS-ELISA commerciaux. Ce résultat pourrait également expliquer la détection différentielle de l'échantillon Quinoa #920 co-infecté par le GFLV et l'ArMV selon les réactifs Bioreba, mais non détecté avec les réactifs Nb anti-GFLV (chapitre 4 paragraphe VI.2.A.).

VI. L'énigme du Nb anti-ArMV 3082

Le Nb 3082 appartient à la famille 19, la famille la plus largement représentée parmi les différentes familles de Nb anti-ArMV. Les différentes étapes et stratégies de production de ce Nb ont mises en lumière une caractéristique surprenante de ce Nb. Le Nb 3082-6HisST produit dans le cytoplasme des bactéries SHuffle et purifié à homogénéité par chromatographie d'affinité HisTrap et StrepTrap a été testé contre une sélection d'isolats infectés par l'ArMV ou par le GFLV, par DAS-ELISA hybride comme décrit figure 4.5. La capture des particules virales est réalisée par les anticorps polyclonaux anti-ArMV ou anti-GFLV commerciaux Bioreba et leur détection par le Nb 3082-6HisST dilué au 1:200. Le spectre de reconnaissance de ce test a été comparé respectivement aux DAS-ELISA commerciaux anti-ArMV et anti-GFLV. Ce Nb-6HisST permet la détection de tous les isolats testés, aussi bien ArMV que GFLV (figure 5.11). Cette capacité de reconnaissance des deux espèces virales à l'aide d'un seul Nb est très intéressante pour le développement d'un test de diagnostic dit « court-noué associé » permettant la détection indifférenciée des deux virus principaux impliqués dans la maladie du court-noué à l'aide d'un seul Nb. Ce type de détection croisée avait déjà été décrite pour un anticorps monoclonal anti-ArMV reconnaissant le GFLV (Frison et Stace-Smith, 1922) mais aussi pour un anticorps monoclonal anti-GFLV reconnaissant l'ArMV (Nölke *et al.,* 2009).

Ayant changé de stratégie de production et de purification des Nb anti-ArMV afin d'améliorer les rendements (paragraphe II.5), j'ai également purifié le Nb 3082-6HisST à partir d'une production périplasmique en bactéries BL21. La spécificité de détection de ce Nb-6HisST périplasmique a également été testée en DAS ELISA hybride. Si le Nb 3082-6HisST produit dans le périplasme présente le même spectre de reconnaissance et une intensité du signal comparables à ceux du Nb3082-6HisST cytoplasmique contre différents isolats

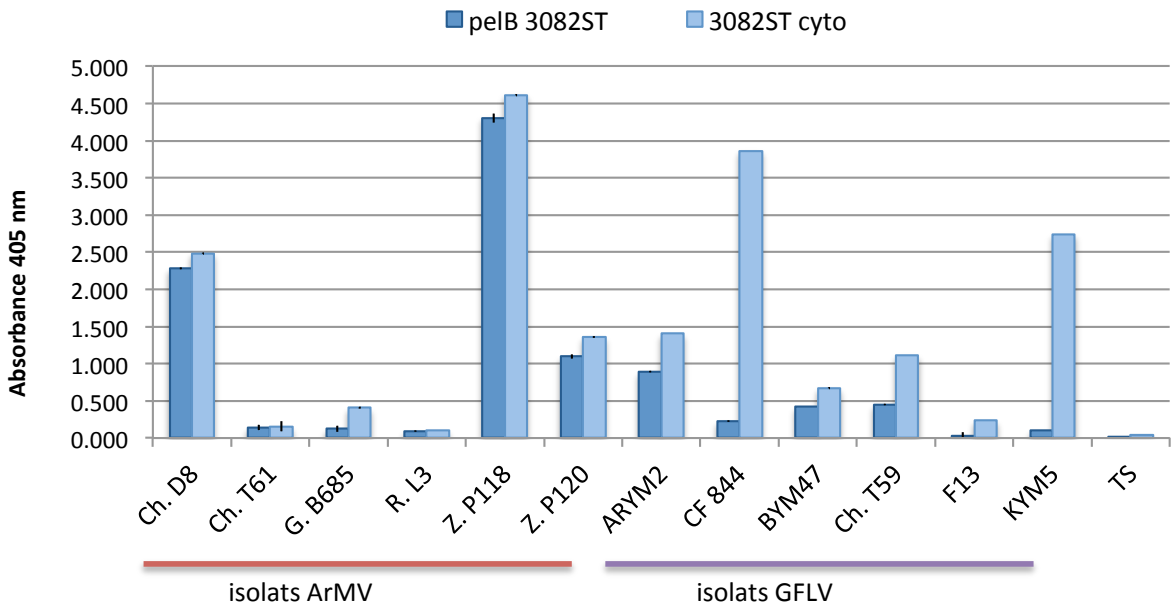


Figure 5.12. **Comparaison des spectres de reconnaissance en DAS-ELISA hybride du Nb 3082-6HisST produit dans le périplasme des bactéries BL21 (pelB 3082ST) ou dans le cytoplasme des bactéries SHuffle (3082ST cyto)** contre six échantillons de vigne infectés par l'ArMV et six échantillons de vigne infectés par le GFLV provenant de la collection de l'INRA de Colmar.

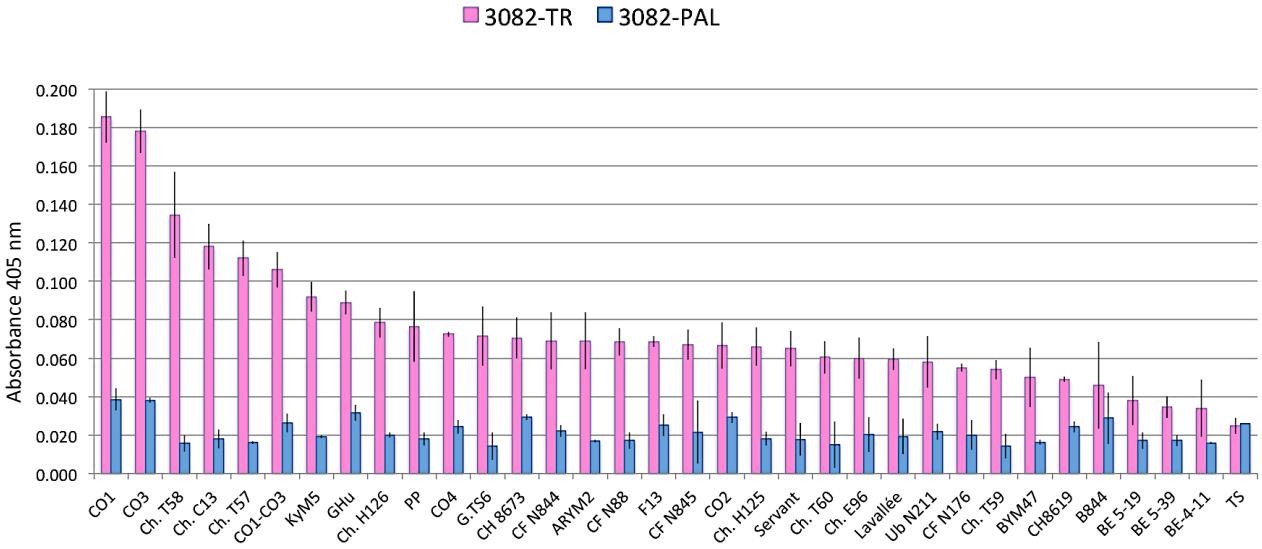


Figure 5.13. **Comparaison du spectre de reconnaissance en DAS-ELISA hybride du Nb 3082-PAL (en bleu) et du Nb 3082-TR (en rose)** contre 33 isolats de GFLV provenant de vignes infectées de la collection de l'INRA de Colmar.

d'ArMV, il ne permet en revanche qu'une très faible reconnaissance des échantillons infectés par le GFLV, (figure 5.12). Ceci est surprenant car ces Nb ne diffèrent au niveau de la séquence protéique que par la présence d'une méthionine en N-terminal des Nb produit dans le cytoplasme. Cependant, le compartiment de production des Nb-6HisST étant différent, les conditions d'oxydo-réduction et la structuration du Nb pourraient être différentes, même si les bactéries SHuffle ont été développées pour favoriser le repliement et l'établissement de ponts disulfure stabilisateurs des protéines dans le cytoplasme (Zarschler *et al.,* 2013), ce qui pourrait expliquer cette différence de spectre de reconnaissance. Ceci pourrait peut être également expliquer la différence de capacité de reconnaissance de l'isolat Z. P116N par les Nb 1047-6HisST et 3082-6HisST issu du cytoplasme (ne reconnaissant pas cet isolat) et par les Nb 1047-6HisST et 3082-6HisST issu du périplasme (reconnaissant cet isolat).

Au cours de ma thèse, le Nb 3082 a ensuite été fusionné à la TagRFP et à la PAL, puis les protéines des fusions ont été produites respectivement dans le cytoplasme des bactéries SHuffle et dans le périplasme des bactéries BL21. Afin d'analyser l'impact du compartiment de production sur la capacité du Nb 3082 à détecter le GFLV, le spectre de ces deux protéines de fusions a été comparé par test hybride en utilisant d'une part les anticorps de coating commerciaux Bioreba et une révélation par les Nb 3082-PAL dilués au 1:20 000, et d'autre part, les Nb 3082-TagRFP dilués au 1:500 pour la capture des particules virales et les anticorps conjugués commerciaux anti-GFLV pour la révélation du test. Ces deux tests ont été réalisés contre 33 isolats de GFLV préalablement diagnostiqués positifs par le kit commercial Bioreba anti-GFLV, provenant de feuilles de vignes infectées de l'INRA de Colmar (figure 5.13). Les Cb 3082-TR sont capables de capturer les particules virales permettant la détection de 27/33 isolats de GFLV. En revanche, aucun Nb-PAL ne permet la détection du GFLV, suggérant encore une fois une réactivité différente d'un même Nb produit dans le cytoplasme (Nb 3082-TagRFP) et dans le périplasme (Nb 3082-PAL).

Afin d'évaluer les capacités de détection de ce Nb lors d'un test complet, un DAS-ELISA composé des Nb 3082-TR dilués au 1:1000 et des Nb 3082-PAL dilués au 1:20 000, a été évalué contre 32 isolats de GFLV et 19 isolats d'ArMV, et comparé respectivement aux kits commerciaux Bioreba anti-GFLV et anti-ArMV (figure 5.14). Comme déjà observé lors des résultats précédents concernant le Nb3082-PAL, le test complet Nb 3082 ne permet la détection d'aucun isolat de GFLV testé. De manière surprenante, le test ne permet la

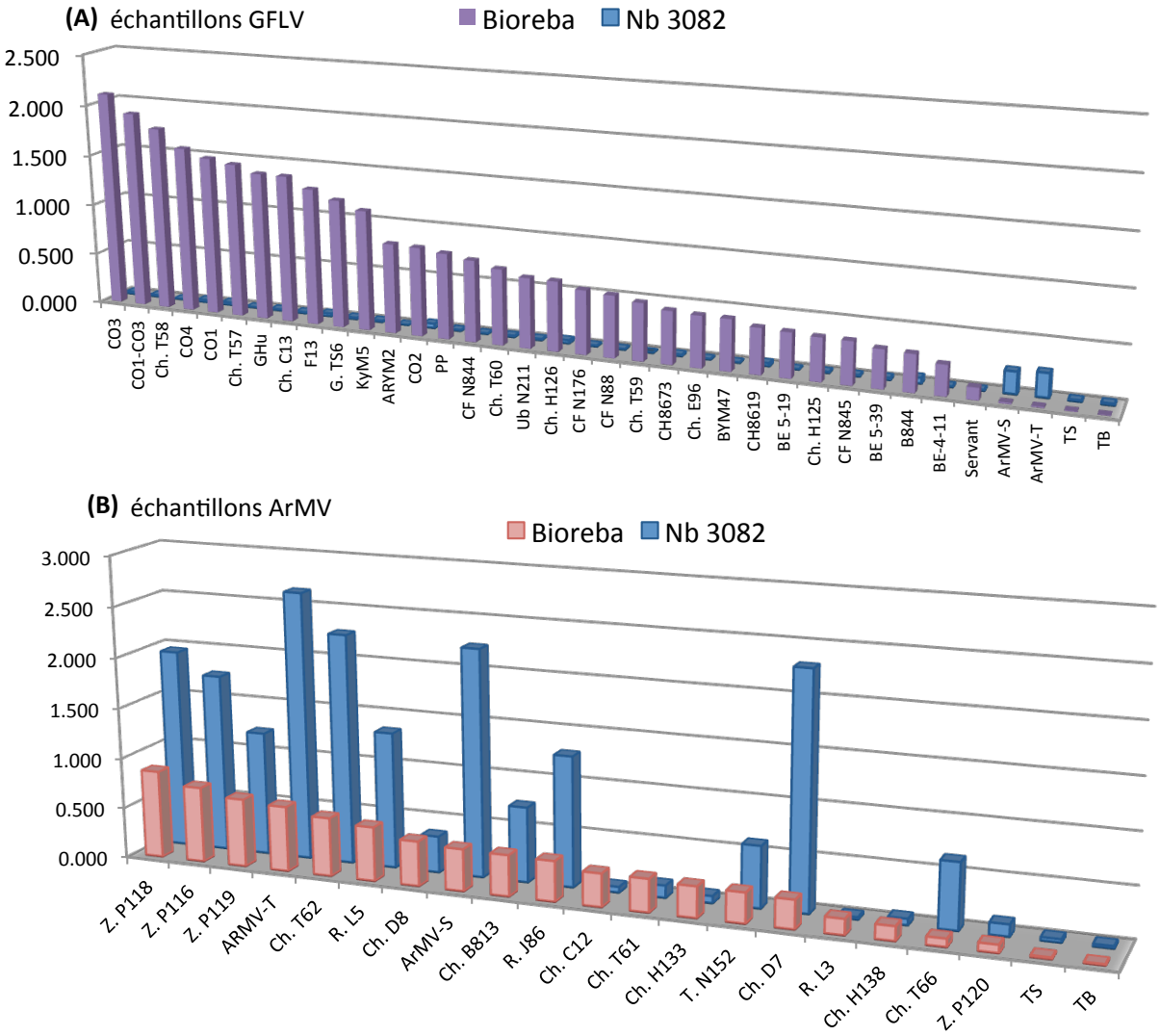


Figure 5.14. **Analyse du spectre de reconnaissance du test complet Nb 3082 (en bleu) comparé aux kits commerciaux Bioreba anti-GFLV (en violet) et anti-ArMV (en rouge)** contre **(A)** 33 isolats de GFLV et **(B)** 19 isolats d'ArMV provenant des collections de vignes infectées de l'INRA de Colmar.

détection que de 15 des 19 échantillons ArMV et présente une absorbance supérieure à celle mesurée pour le kit Bioreba pour 10 des 19 échantillons testés. Cette non reconnaissance des échantillons isolats d'ArMV (Ch. C12, Ch. H133, R. L3 et Ch. H138) est surprenante puisque le Nb 3082-PAL en test hybride (figure 5.8) permet la détection de ces mêmes isolats avec une intensité de signal supérieure à celle du kit commercial Bioreba. Il semble donc que l'absence de reconnaissance de ces isolats ne soit pas liée au Nb 3082-PAL, mais plutôt à l'absence de capture de ces isolats par le Nb 3082-TR. Il serait intéressant d'investiguer les capacités de reconnaissance des 10 autres Nb de la famille 19, parmi lesquels se trouve peut être, un Nb réellement capable de détecter l'ArMV et le GFLV quel que soit son compartiment de production.

Chapitre VI. Structure et modélisation de complexes Nb-virus

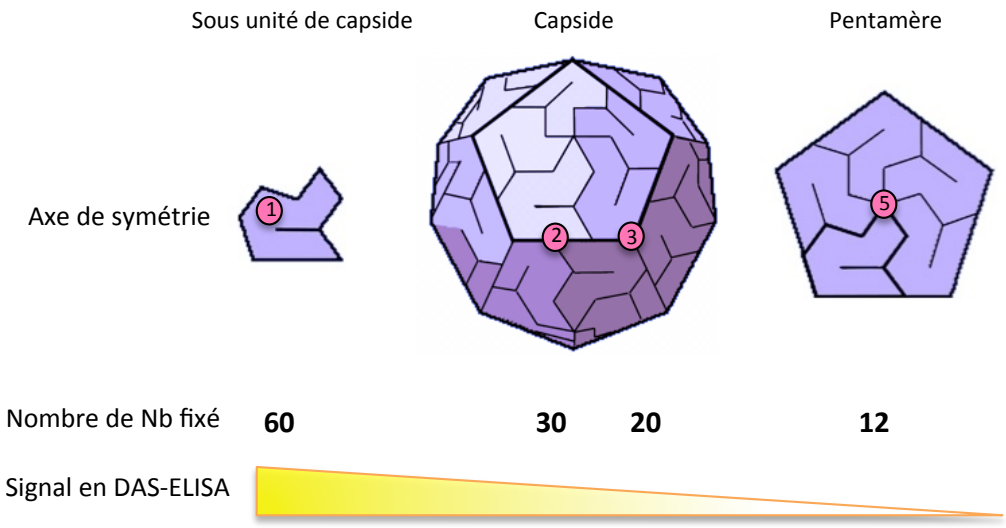


Figure 6.1. Représentation des axes de symétrie issus de l'assemblage des sous-unités de la protéine de capside du GFLV. En fonction de l'épitope reconnu par le Nb, le nombre de Nb par virion peut être de 60, 30, 20 ou 12. L'intensité de signal en DAS-ELISA est proportionnelle au nombre de Nb fixé à la surface de la particule virale.

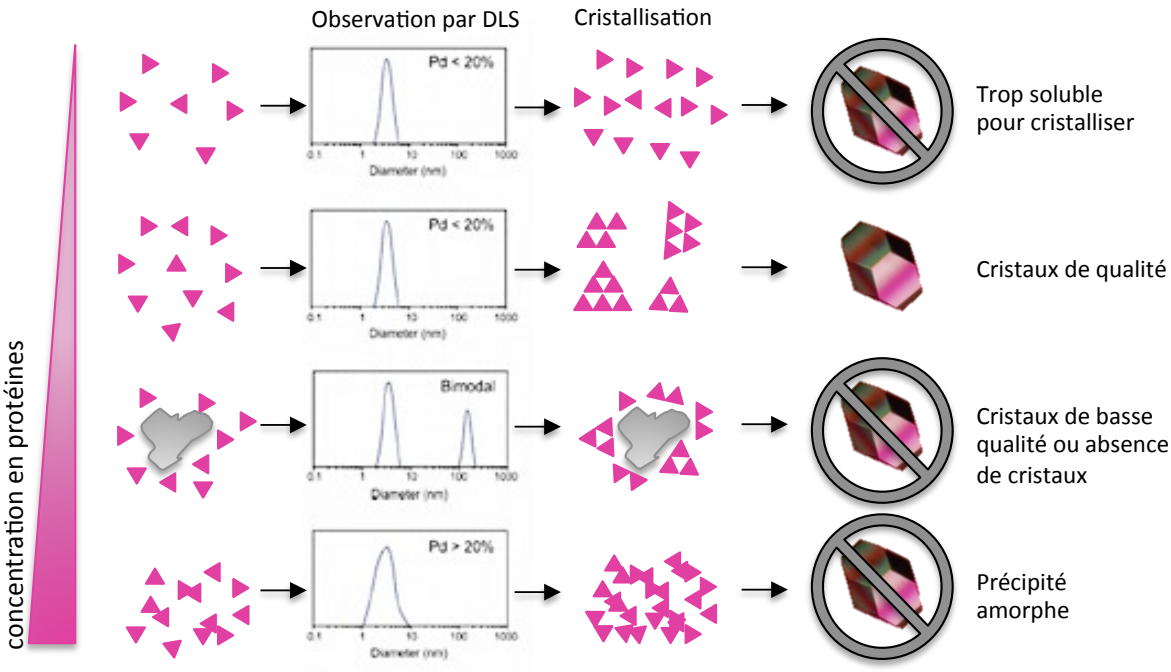


Figure 6.2. Schéma des conditions de cristallisation et des résultats attendus. L'analyse en lumière diffusée (DLS) sert à vérifier la pureté et l'homogénéité des protéines avant cristallisation. Les résultats se présentent sous la forme d'un graphique, montrant la distribution du diamètre des molécules en solution en fonction de l'intensité diffusée. La largeur du pic indique leur monodispersité (pic étroit) ou leur polydispersité (pic large). Les triangles roses représentent les protéines en solution.

Chapitre VI. Structure et modélisation de complexes Nb-virus

L'analyse du spectre de reconnaissance des Nb anti-GFLV, montre que les Nb de la famille majoritaire, et en particulier les Nb 23 et p75, reconnaissent le plus grand nombre d'isolats de GFLV de la collection provenant de vignes infectées de l'INRA de Colmar. L'un des Nb de cette famille majoritaire, le Nb 23, exprimé de manière constitutive dans *Nicotiana benthamiana,* confère une résistance à au moins 8 isolats différents de GFLV (Hemmer *et al.,* 2016, voir ci-après). Ces deux résultats m'ont amenée à étudier en détails l'épitope reconnu par ce Nb à la surface de la capside du GFLV.

La particule virale icosaédrique du GFLV est composée de 60 sous-unités de la protéine de capside (CP) qui s'organisent autour d'axes de symétrie d'ordre 1, 2, 3 et 5. Le nombre d'épitopes reconnus par le Nb peut donc théoriquement être de 60, 30, 20 ou 12 (figure 6.1). Le signal en DAS-ELISA étant proportionnel au nombre de Nb fixé à la surface des particules virales, il était donc intéressant de savoir si les Nb au spectre large de la famille majoritaire sont capables de se fixer à un épitope présent soixante fois à la surface de la particule virale, conduisant à un signal maximal en ELISA.

I. Observation et caractérisation du complexe Nb 23/GFLV-F13

La structure atomique du GFLV ayant déjà été décrite au laboratoire (Schellenberger *et al.,* 2011), la première approche envisagée pour caractériser l'épitope reconnu par le Nb 23 a été de résoudre la structure du complexe Nb 23/GFLV-F13 par cristallographie, dans le but d'identifier les résidus en interaction. L'obtention de cristaux protéiques de qualité nécessite à la fois la production de protéines pures mais aussi l'identification des concentrations et des conditions optimales de cristallisation (McPherson, 2004, figure 6.2). La pureté et l'homogénéité des échantillons de virus et de Nb sont généralement évaluées par diffusion de lumière (*Dynamic Light Scattering* ; DLS) avant les essais de cristallisation. Cette technique permet de vérifier l'absence d'agrégats et d'estimer le diamètre moyen de particules en solution. Les mesures de DLS sont possibles car les particules virales du GFLV sont icosaédriques, et donc quasi-sphériques, quelque soit l'orientation des particules dans la solution. La lumière diffusée au cours du mouvement brownien des particules en solution est collectée par un détecteur de photons. Un corrélateur, calcule une fonction

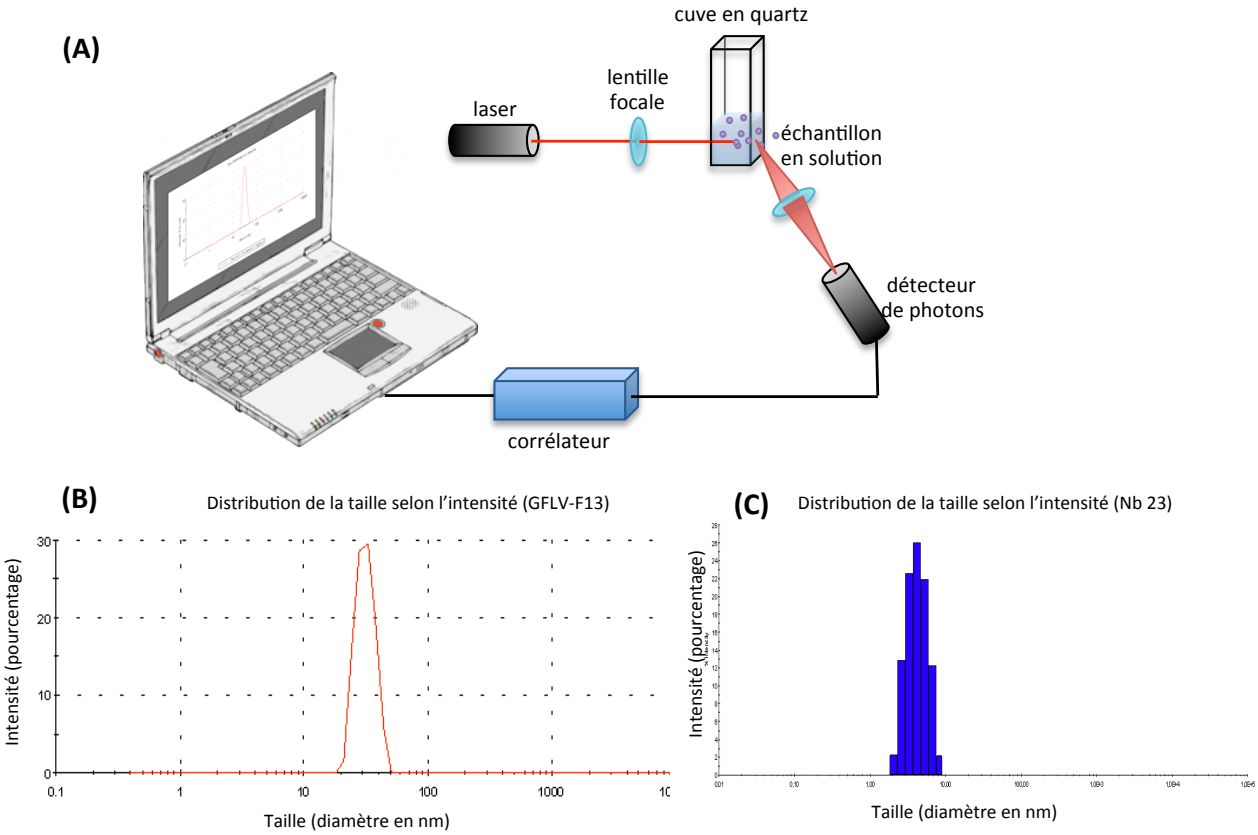


Figure 6.3. **(A) Schéma du fonctionnement d'un instrument de mesure de diffusion de lumière** (DLS). Les résultats des mesures de DLS se présentent sous la forme d'un graphique représentant la distribution du diamètre des molécules en solution selon l'intensité diffusée. Un pic unique indique que l'échantillon est monomodal et le pic étroit que celui-ci est monodisperse. **(B)** Analyse de DLS du GFLV-F13 seul par l'instrument Zetasizer NanoZ (**C)** Analyse de DLS du Nb 23 seul par l'appareil Nanostar.

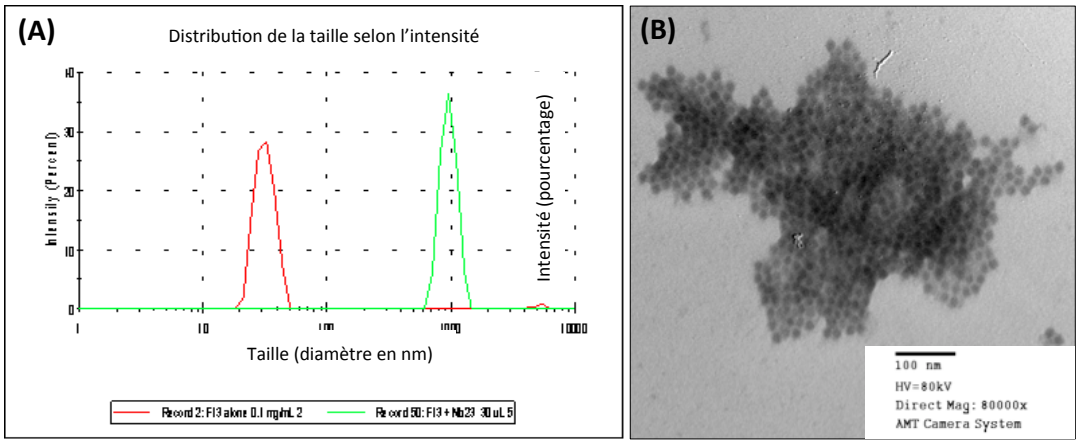


Figure 6.4. (A) Mesure par DLS de la taille du virus GFLV-F13 seul (en rouge) et de celle du complexe GFLV-F13/Nb 23 (en vert). **(B)** Observation du complexe GFLV-F13/Nb 23 par microscopie électronique.

d'autocorrélation à partir de laquelle est déduite le coefficient de diffraction, qui varie en fonction de la taille des particules. Les résultats de l'analyse se présentent alors sous la forme d'un graphique, représentant la distribution du diamètre des molécules en solution selon l'intensité lumineuse diffusée (figure 6.3.A). Un pic unique montre une population de protéines monomodales alors que la présence de plusieurs pics indique plusieurs populations de protéines, et donc un échantillon plus hétérogène. Les mesures de DLS, destinées à vérifier la pureté et l'homogénéité du virus et des Nb, ont été réalisées avec Bernard Lorber (Institut de biologie moléculaire et cellulaire, IBMC, Strasbourg).

En premier lieu, j'ai purifié le virus GFLV-F13 à partir de feuilles de *C. quinoa* à l'INRA de Colmar puis mesuré son homogénéité par DLS à l'aide de l'instrument Zetasizer NanoZ (Malvern ; figure 6.3.B). Le pic d'intensité unique et étroit confirme la présence d'une seule population virale monodisperse de diamètre moyen mesuré de 32 nm. La pureté et l'homogénéité du Nb 23 ont été analysée par DLS, à l'aide de l'instrument Nanostar (Wyatt technologies ; figure 6.3.C), plus sensible que le Zetasizer NanoZ, et compatible avec la mesure du diamètre de particules plus petites. Le pic unique et étroit du Nb 23 montre que l'échantillon est monomodal et monodisperse, et établit un diamètre moyen des Nb à 3.5 nm, conformément à la taille de Nanobodies d'après la littérature (Muyldermans, 2001).
La pureté et l'homogénéité de chacun des partenaires du complexe ayant été vérifiées, j'ai ensuite effectué une titration du GFLV-F13 en ajoutant successivement des quantités de Nb suffisantes pour atteindre théoriquement 12, 20, 30, 60 ou 100 Nb par virion. Le mélange Nb 23/GFLV-F13 a été réalisé dans les conditions ayant permis au préalable la cristallisation du virus GFLV-F13 seul (Schellenberger *et al.,* 2011), dans une solution HEPES pH 7.4 150 mM NaCl. Nous pensions pouvoir observer une augmentation de la taille moyenne des particules en solution, prouvant l'interaction entre les Nb et le GFLV-F13. L'effet de la fixation des Nb sur la CP a été évalué par l'appareil Zetasizer NanoZ en comparant le diamètre des particules en solution en présence de Nb (en vert) avec celui du virus seul (en rouge ; figure 6.4). De manière surprenante, en présence de Nb, une forte augmentation du diamètre moyen des particules (d'environ 1000 nm) a été observée. Comme cette taille n'était pas corrélable aux tailles de la particule virale seule (environ 32 nm) ou des particules virales recouvertes de Nb (au maximum 35.5 nm en théorie), l'échantillon a alors été analysé en microscopie électronique à transmission, révélant la présence d'agrégats contenant des particules virales (figure 6.4). Le Nb étant monovalents contrairement aux Ig conventionnelles, ils ne peuvent

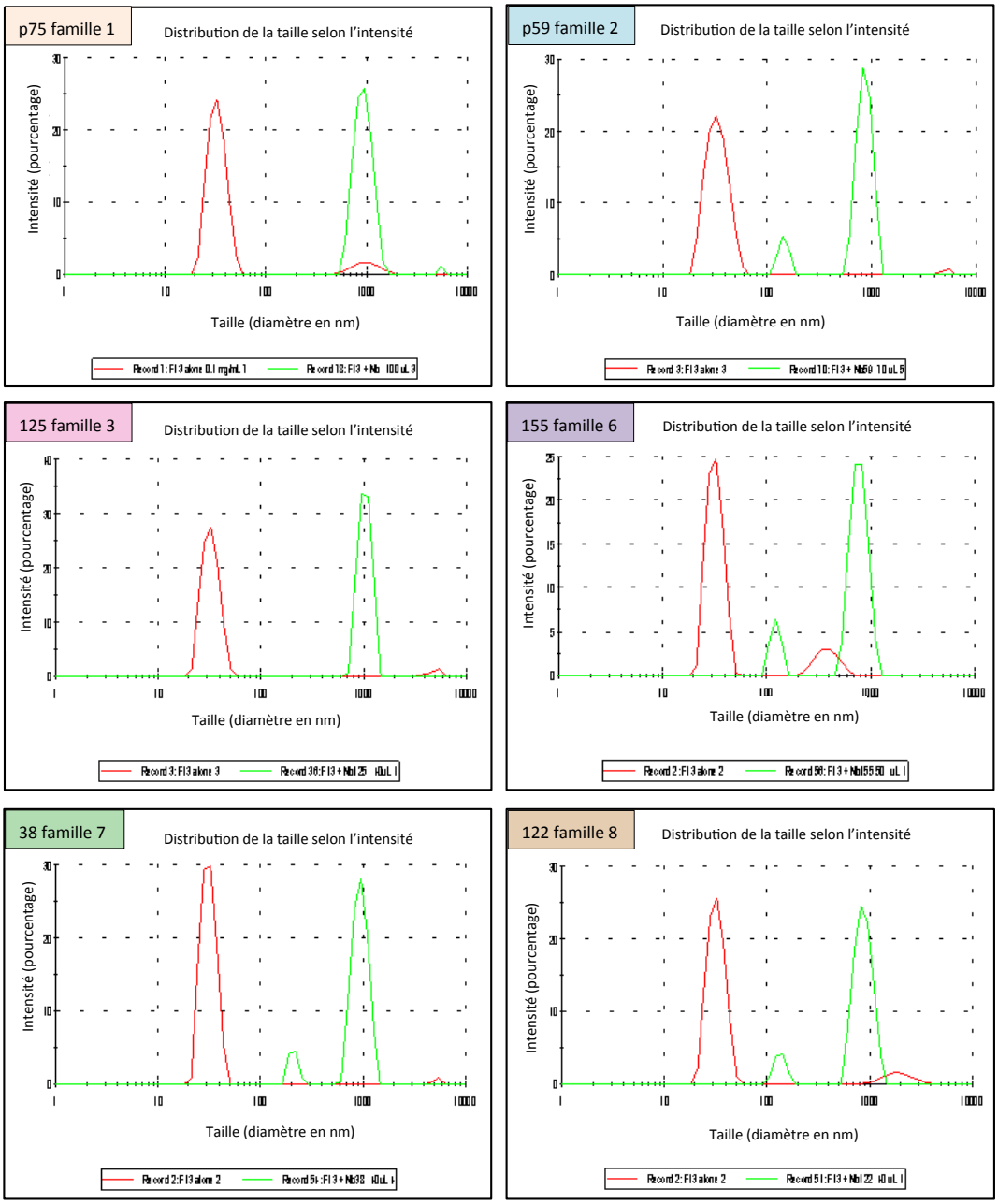


Figure 6.5. Évaluation de la taille du complexe Nb/GFLV-F13 par diffusion de lumière (instrument Zetasizer NanoZ) pour des Nb de six familles différentes (instrument Zetasizer NanoZ). Les résultats des mesures de DLS se présentent sous la forme d'un graphique représentant la distribution du diamètre des molécules en solution selon l'intensité diffusée. La taille du virus GFLV-F13 seul (en rouge) est comparée à celle du complexe GFLV-F13/ Nb (en vert).

pas conduire à des phénomènes d'agglutination, résultant de la formation d'un réseau antigène/anticorps, typique des anticorps classiques.

Afin de déterminer s'il s'agissait d'une particularité du Nb 23, j'ai analysé l'effet de la fixation de Nb de 6 familles différentes sur le GFLV-F13 (figure 6.5). Dans tous les cas, les mesures de DLS montraient une augmentation très importante de la taille des molécules, signe de la formation d'agrégats. J'ai également testé un variant du GFLV, le GFLV-TD, dont la structure a également été établie par cristallographie, et qui est plus soluble que le GFLV-F13 (Schellenberger *et al.,* 2011). Lors de la mise en présence du GFLV-TD avec les Nb, l'agrégation du complexe est toujours observée lors de la titration de ce virus avec les Nb 23 ou p59 mais pas avec le Nb 122 (figure 6.6.A). En DAS-ELISA hybride, le Nb 122-ST ne reconnait pas le GFLV-TD (figure 6.6B), ce qui suggère que la formation d'agrégats résulte de la fixation des Nb sur la particule virale et non de la seule mise en présence des deux composés.

1. Recherche des conditions optimales de la formation du complexe Nb/GFLV

La présence d'agrégats peut être la conséquence d'un pH inadapté ou d'une concentration en sel insuffisante. L'effet du pH a été analysé d'abord sur les particules virales seules, puis sur le complexe Nb-virus. Le virus seul a été dilué dans des solutions tamponnées à sept différentes valeurs de pH (pH 3.9 ; 5.3 ; 6.0 ; 7.4, 8.3 ; 9.5 et 11.0) et les échantillons ont été conservés à 20°C jusqu'à 30 jours. L'apparition d'agrégats a été suivie par DLS en mesurant l'intensité diffusée (kcps) et la distribution de la taille des molécules au cours du temps (figure 6.7). À pH 3.9 les particules virales s'agrègent instantanément (résultat non montré), probablement car ce pH est très proche du pHi du virus établi à pH 4.0 sur la base de la composition en acides aminés de la CP (Hewitt, 1970). À son pHi, la solubilité du virus est minimale et la capside se comporte comme une molécule neutre ; ses possibilités d'interaction avec l'eau par le biais de liaisons hydrogènes sont alors minimales, entrainant son agrégation. En dessous du pH 7.4, la capside semble la moins stable et des agrégats sont apparus après six jours à 20°C. À pH 7.4 et plus, la capside est plus stable. Quelques agrégats sont apparus à pH 9.5 et 11.0 après 20 jours, et aucune agrégation n'a été observée après 30 jours à pH 7.4 et 8.3.

L'influence du pH a ensuite été évaluée, également par DLS, sur le complexe Nb-virus. Les expériences ont été réalisées avec du GFLV-F13 et le Nb 23 à trois pH différents (pH 5.3, 7.4

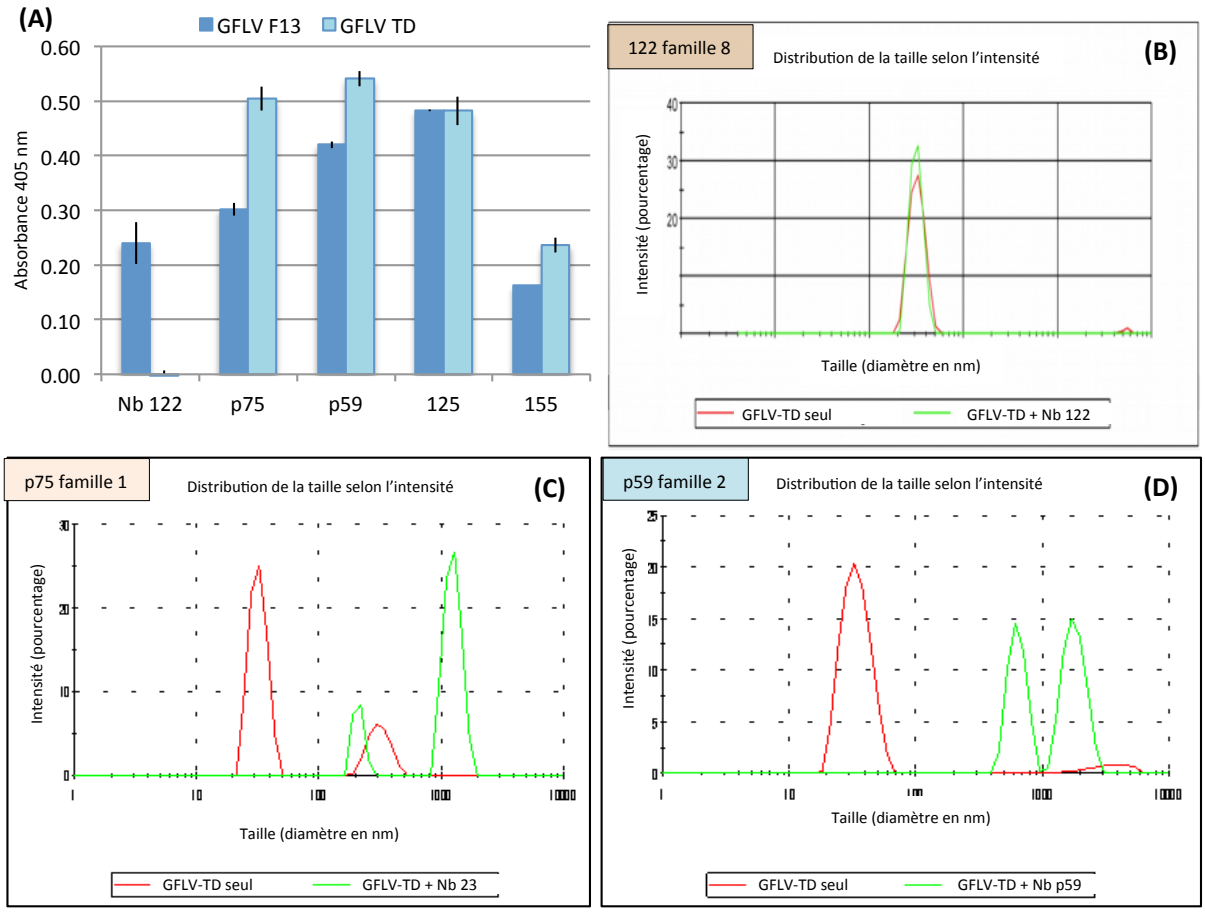


Figure 6.6. (A) DAS-ELISA hybride réalisé contre le GFLV-F13 et son variant le GFLV-TD (portant une mutation ponctuelle en position 297) où la capture des particules virales est réalisée à l'aide des anticorps anti-GFLV commerciaux (Bioreba) et la détection par les Nb-6HisST 122, p75, p59, 125 et 155. **(B-D)** Évaluation de la taille du complexe GFLV-TD/Nb par DLS pour des Nb p75 **(B)**, Nb p59 **(C)** , Nb 122 **(D)** appartenant à trois familles différentes. La taille du virus GFLV-TD seul (en rouge) a été comparée à celle du complexe GFLV-TD/ Nb (en vert).

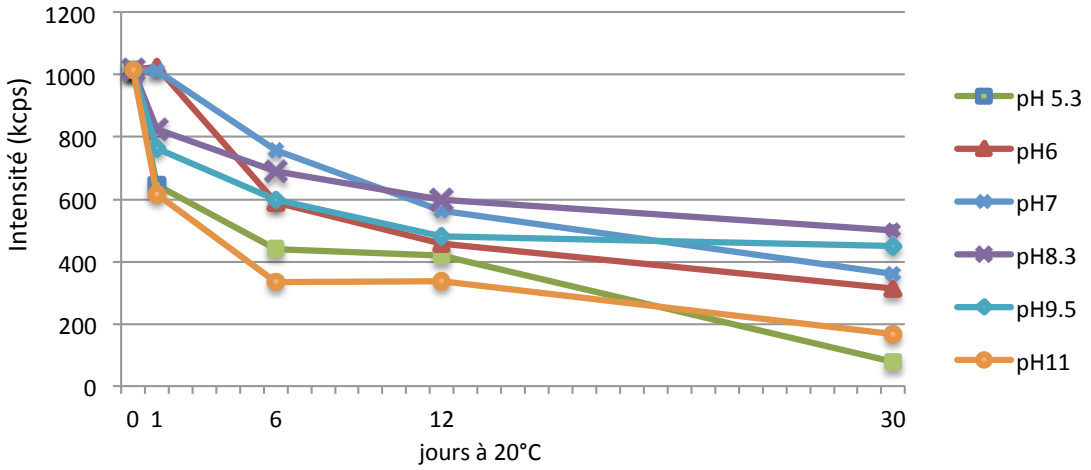


Figure 6.7. Évolution de l'intensité diffusée mesurée par DLS après stockage du virus GFLV-F13 à 20°C dans des tampon à différents pH jusqu'à 30 jours. Ces mesures ont été réalisées par l'instrument Zetasizier NanoZ. kcps = kilo coups par secondes.

et 8.3). La taille du complexe (en vert) est comparée à la taille du virus seul (en rouge, figure 6.8.A). À pH 5.3 et pH 7.4, en présence de Nb, le diamètre moyen du complexe est voisin de 1000 nm traduisant la formation d'agrégats (figure 6.8 A, B). En revanche, à pH 8.3, aucune agrégation n'est observée, même en présence d'un large excès de Nb par virion. L'augmentation du diamètre moyen de la particule virale de GFLV de 32 nm à 35,5 nm en présence des Nb montre que les Nb sont effectivement capables de se fixer à la surface des particules virales et que le diamètre moyen mesuré en DLS correspond au diamètre maximal théorique. Afin de confirmer que l'utilisation d'un tampon à pH 8.3 est la plus adaptée, deux autres complexes Nb/virus ont été évalués avec deux Nb de la famille majoritaire, les Nb p75 et 126 (résultats non montrés). Les diamètres moyens des complexes mesurés sont de 34,5 pour le Nb p75 et de 35,5 nm pour le Nb 126, confirmant les résultats obtenus avec le Nb 23. Les conditions de formation du complexe Nb/virus ayant été identifées, des essais de cristallisation ont alors été menés, toujours avec Bernard Lorber à l'IBMC.

II. Essais de cristallisation du complexe Nb 23/GFLV-F13

Le pH 8.3 étant celui pour lequel la capside semble la plus stable et pour lequel aucune agrégation n'est observée en présence de Nb, cette condition a été retenue pour des essais de cristallographie du complexe Nb23/GFLV-F13, afin d'identifier les résidus impliqués dans l'interaction Nb-virus. Plusieurs concentrations de virus, de Nb et de PEG ont été testées pour favoriser la cristallisation du complexe. En premier lieu, le crible commercial INDEX (Hampton Research) a été réalisé afin d'identifier les conditions favorables à la cristallisation du complexe. Les gouttes de 150 nl des différentes conditions de cristallisation ont été déposées en plaque 96 puits Greiner BioOne à l'aide de l'instrument Mosquito TTP (LabTech). Aucun cristal n'ayant été obtenu dans les différentes gouttes effectuées, les conditions de cristallisation du GFLV-F13 seul ont été utilisées (100 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, PEG-3350) en remplaçant le tampon HEPES par du tampon Tris 100 mM pH 8.3. Par deux fois, des cristaux ont été obtenus pour une concentration de GFLV-F13 de 14 mg/ml, en présence de 4 % ou 5% (m/v) de PEG-3350 avec une stœchiométrie de 100 Nb par virion. Les cristaux formés en présence de 4% de PEG-3350 sont les plus grands, et mesurent jusqu'à 40 µm de long (figure 6.8.D). Les clichés de diffractions, obtenus après congélation des cristaux, ne contenaient malheureusement pas d'intensité diffractée mesurable sur la ligne Proxima-2 du synchrotron SOLEIL à Saint-Aubin. L'approche de cristallographie a alors

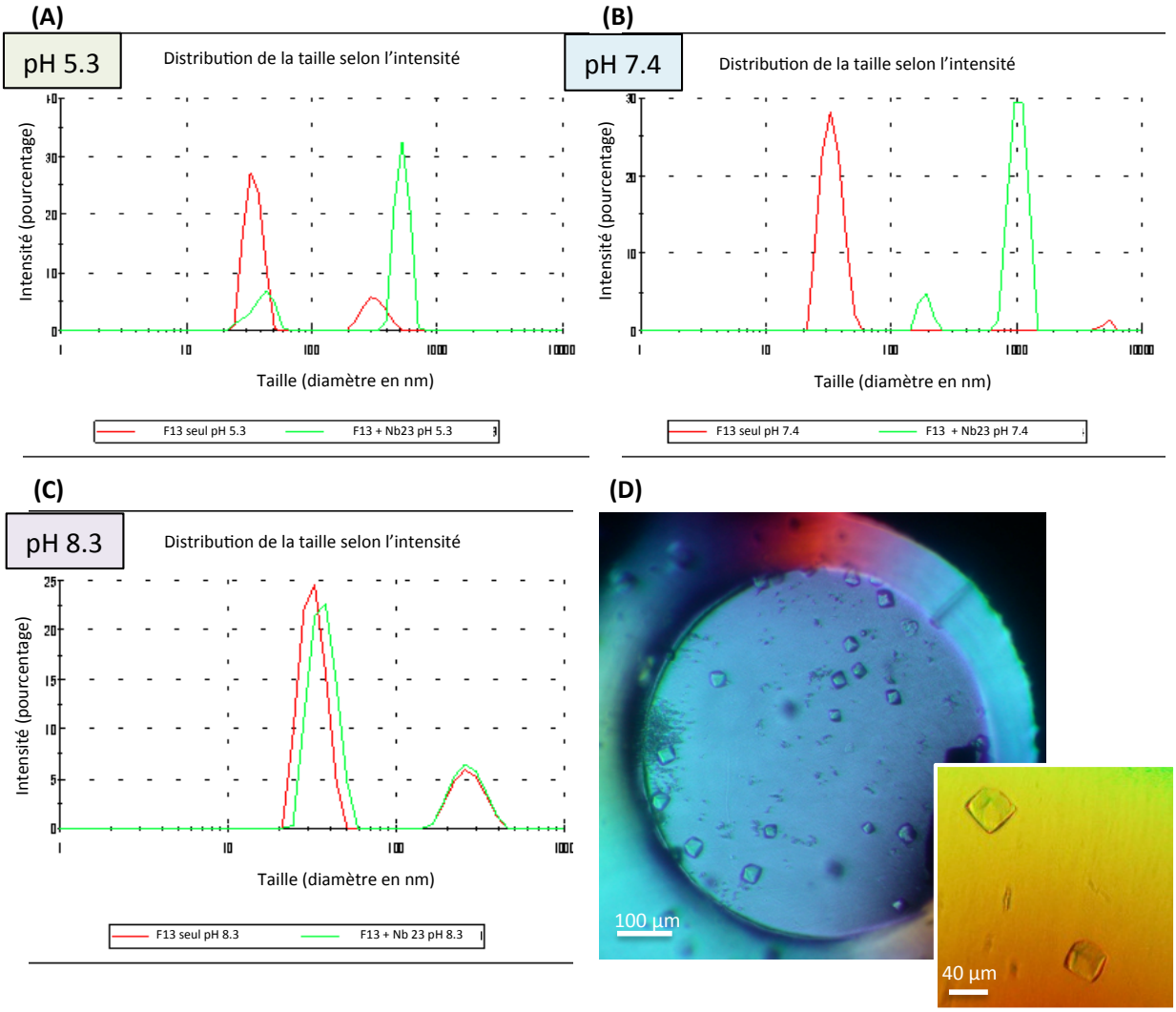


Figure 6.8. (A-C) Comparaison de l'effet de trois pH différents (pH 5.3, pH 7.4 et pH 8.3) sur le complexe GFLV-F13/Nb 23, analysé par diffusion de lumière. La taille du virus seul (en rouge) a été comparée à celle du complexe (en vert). Ces mesures ont été réalisées par l'instrument Zetasizier NanoZ. **(D) Cristaux du complexe Nb 23/GFLV-F13** obtenus à pH 8.3 observés à la loupe binoculaire sous lumière transmise.

été abandonnée au profit d'une approche de cryomicroscopie électronique à transmission menée en parallèle avec Bruno Klaholz et Igor Orlov (Institut Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire, IGBMC, Strasbourg).

III. Résolution de la structure du complexe Nb 23/GFLV-F13

La microscopie électronique en conditions cryogénique (*cryo-electromicroscopy* ; cryo-EM) permet d'observer des échantillons congelés rapidement dans de l'éthane liquide préservant leur structure native. Les images obtenues par cryo-EM sont ensuite utilisées pour construire un modèle 3D de protéine(s) d'intérêt à haute résolution. Le modèle 3D du complexe Nb 23/GFLV-13 a été obtenu par Bruno Klaholtz et Igor Orlov (IGBMC, Strasbourg) dans le cadre de l'ANR Combining.

Un modèle tridimensionnel du complexe Nb 23/GFLV-F13 a été construit *in silico* en combinant les projections à deux dimensions de 6139 particules sélectionnées à partir de 1550 acquisitions (figure 6.9.A). Ce modèle a été affiné en s'appuyant sur la structure cristallographique du GFLV déjà obtenue en collaboration avec Bernard Lorber (PDB 4V5T/2Y7T ; Schellenberger *et al.,* 2011a). La structure du Nb 23 a été modélisée *via* le site internet Swiss-model (swissmodel.expasy.org ; Biasini *et al.,* 2014) à partir de différentes structures de Nb existantes et disponibles sur des bases de données (voir paragraphe IV de ce chapitre). La structure du Nb 23 a été résolue à partir du modèle de prédiction du Nb 23 dérivant du cAb-Lys3 VHH (PDB 1XFP; De Genst *et al.,* 2004; 69.23% d'identité de séquence avec le Nb 23) qui donnait la meilleure corrélation par *rigid-body fitting* dans une construction du complexe Nb 23/GFLV-F13 à faible résolution. Les premières images du complexe ont été acquises à l'aide du microscope Polara TF30 D320, puis un nouveau microscope, le Titan Krios, a ensuite permis d'atteindre une résolution rivalisant avec celles généralement atteintes en cristallographie. Celle-ci est estimée à 2,8 Å par corrélation des enveloppes de Fourier (*Fourier shell correlation*, FSC) et a contribué à définir avec exactitude le site de fixation du Nb 23 sur la particule virale, permettant d'identifier deux zones d'interactions, situées au niveau des domaines A et B de la protéine de capside (figure 6.9.B et C), mais aussi de définir précisément les résidus du Nb et de la CP en interaction (voir en fin de ce chapitre Hemmer *et al.,* 2016). La qualité des images dépasse de loin celles obtenues avec la plus haute résolution en cryo-EM (4,8 Å) avec des Nb neutralisant le poliovirus (Schotte *et al.,* 2014). Une projection 2D de la capside virale du GFLV-F13, calculée

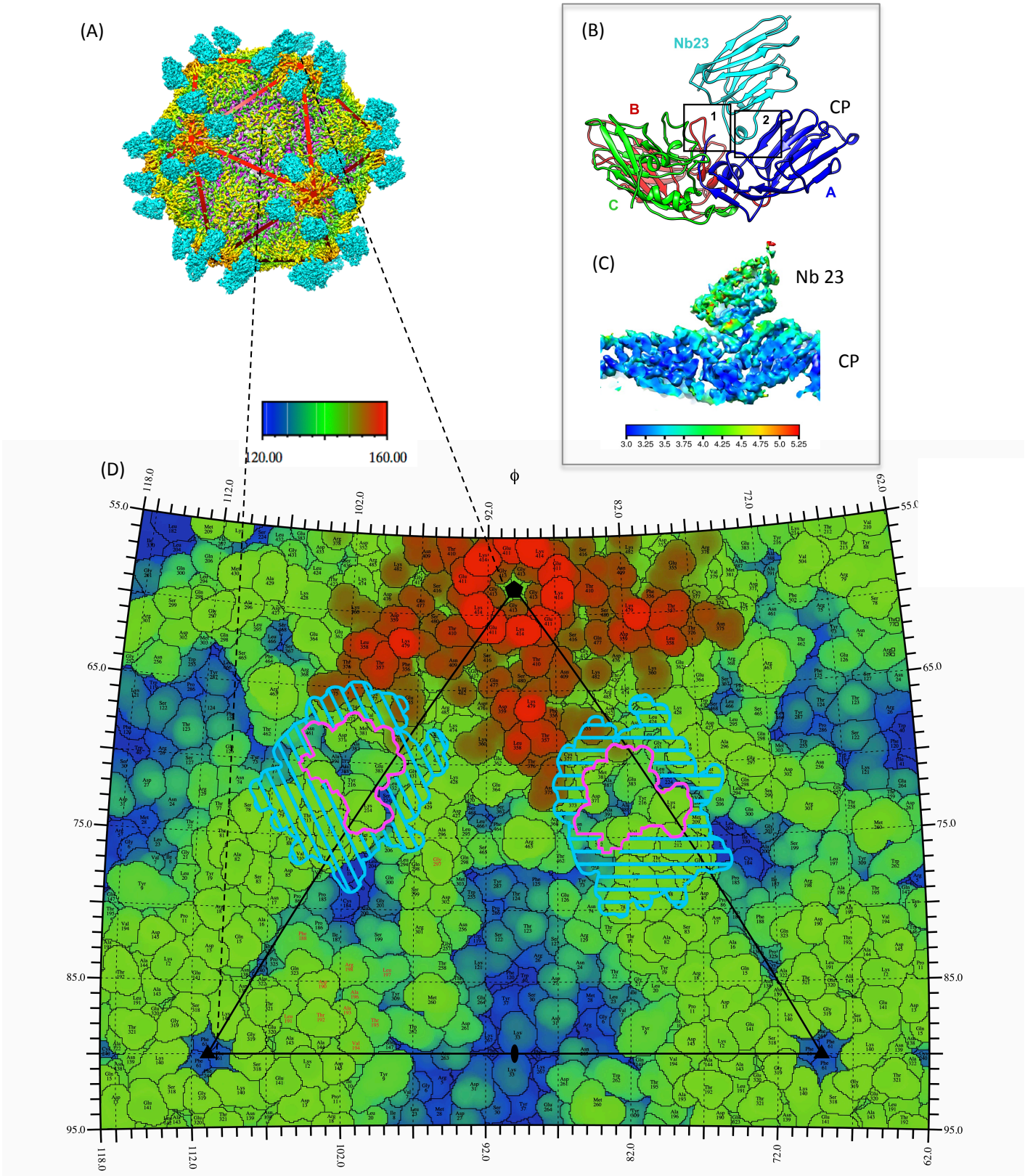


Figure 6.9. (A) Structure 3D du complexe Nb 23/GFLV-F13 résolue par cryo-EM. **(B)** Représentation en ruban de la zone d'interaction entre la protéine de capside et le Nb 23, montrant le contact du Nb 23 avec deux zones notées 1 et 2, appartenant respectivement aux domaines B et A de la protéine de capside du GFLV. **(C)** Carte de densité électronique locale en coupe transversale de la région d'interaction Nb 23/GFLV-F13 avec une résolution comprise entre 5,25 Å (rouge) et moins de 3,0 Å (bleu) **(D)** Représentation 2D de la capside du GFLV par RIVEM avec en magenta la région reconnue par le Nb 23 et en cyan, la projection de la taille totale du Nb 23 sur la capside du GFLV.

par *Radial Interpretation of Viral Electron density Maps* (RIVEM, Xiao et Rossmann, 2007), permet de visualiser le site de fixation du Nb (en magenta figure 6.9.D) ainsi que la projection du contour du Nb sur la particule virale (en cyan figure 6.9.D), montrant l'encombrement inhérent à la fixation du Nb en surface de la capside.

Le Nb 23 est capable de se fixer sur le monomère de la protéine de capside (CP) et reconnaît un épitope bordant une cavité, présent 60 fois à surface de la capside virale et conservé parmi les différents isolats de GFLV testés. Les Nb de la famille majoritaire sont donc intéressants non seulement en terme de spectre de reconnaissance mais aussi en raison de leur fixation sur chacune des sous-unités de la CP, ce qui permet théoriquement un signal optimal en ELISA, confirmant encore une fois leur intérêt dans un DAS-ELISA Nb anti-GFLV. Ces résultats ont également permis de mettre en lumière les résultats obtenus par Caroline Hemmer, sur l'obtention de plantes transgéniques exprimant le Cb 23-EGFP résistantes à l'infection par le GFLV-GHu et par 8 autres variants de GFLV (voir article en fin de chapitre). L'obtention d'un isolat viral contournant cette résistance sous forte pression d'inoculum et sa caractérisation par séquençage du gène de la CP montre que cet isolat possède 3 acides aminés supplémentaires en C–terminal de la CP. Ce variant a été nommé GFLV-GHu+3. Pour déterminer si cette mutation engendre une perte totale de reconnaissance ou seulement une diminution de l'affinité du Nb 23 pour la capside virale j'ai réalisé un DAS-ELISA avec les Cb 23-EGFP purifiés, afin d'évaluer la même construction que celle présente de manière constitutive dans les plantes transgéniques *N. benthamiana*. Le Cb 23-EGFP a été comparé au Cb p59-TagRFP et au réactif de coating Bioreba pour la capture des particules virales, puis le test a été révélé par les anticorps conjugués anti-GFLV Bioreba commerciaux (figure 6.10). Les mesures d'absorbance, similaires pour le GFLV-GHu et le GHu+3, indiquent que les Cb p59-TagRFP et les anticorps Bioreba capturent aussi bien le GFLV-GHu que son mutant. Pour le Cb 23-EGFP, les mesures d'absorbance contre le mutant GHu+3 sont jusqu'à 7 fois plus faible que pour le virus sauvage mais néanmoins au dessus du seuil de positivité. Ceci indique une plus faible affinité du Cb 23 pour le GFLV-GHu+3, pouvant expliquer que ce mutant soit capable de contourner la résistance induite par ce Cb. Des analyses complémentaires ont alors été réalisées à l'INRA de Colmar par Aurélie Marmonier et Sophie Gersch pour savoir si ce mutant pouvait être transmis par les nématodes *X. index*. Les résultats montrent qu'il n'est pas transmissible, et donc que cette modification d'épitope ne permet pas la propagation du mutant GHu+3 par nématodes. Ceci suggère encore une fois

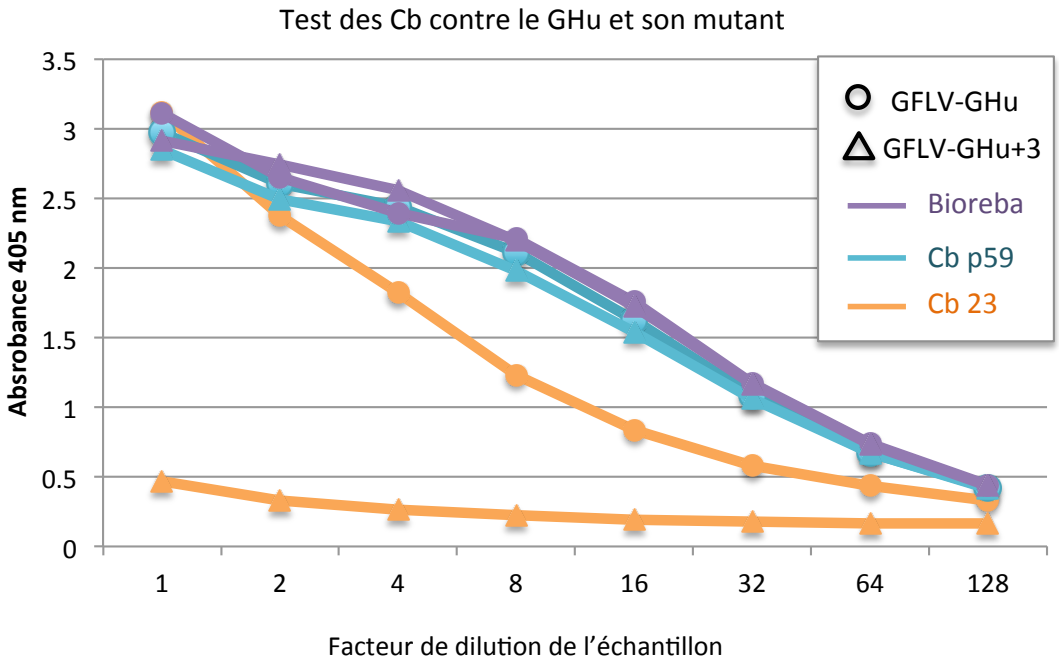


Figure 6.10. DAS-ELISA contre l'isolat GFLV-GHu et son mutant l'isolat GFLV-GHu+3 réalisé grâce aux Cb 23-EGFP ou p59-TR ou aux anticorps commerciaux anti-GFLV Bioreba pour la capture des particules virales, et aux anticorps conjugués anti-GFLV Bioreba pour la révélation du test ELISA. Le mutant GFLV-Ghu+3 comporte 3 acides aminés additionnels en C-terminal de la protéine de capside.

que les Nb de la famille majoritaire sont un outil robuste utilisable pour le diagnostic, puisque l'épitope qu'ils ciblent est non seulement fortement conservé parmi les différents isolats de GFLV mais qu'en plus, sa modification empêche la transmission virale par nématode, ce qui devrait prévenir sa propagation au vignoble. Ceci montre également l'intérêt d'utiliser un cocktail de Nb pour un test de diagnostic, le Nb p59 permettant la reconnaissance de ce variant sans perte d'affinité.

IV. Analyses bioinformatiques

En vue d'identifier les différents épitopes reconnus par notre collection de Nb anti-GFLV, notamment ceux impliqués dans le test de diagnostic Nb anti-GFLV (Nb p75, p59, 125 et 155) mais aussi du Nb 122 (qui ne reconnait pas le variant GFLV-TD), sans avoir recours à des approches structurales, j'ai opté pour une approche de modélisation de structure 3D *in silico* des Nb seuls, puis j'ai utilisé un programme de prédiction d'interaction protéine-protéine pour caractériser les complexes Nb/virus.

2. Modélisation de la structure 3D des Nb

La modélisation des Nb a été réalisée grâce au serveur Swiss-model (swissmodel.expasy.org), qui permet la recherche de protéines matrices similaires (*template*) à la protéine d'intérêt. La modélisation s'appuie sur une structure de protéine résolue pour proposer un modèle plausible de structure de la protéine d'intérêt. Afin de sélectionner la meilleure modélisation de Nb anti-GFLV j'ai défini les critères de sélection des protéines matrices comme suit : la protéine matrice sélectionnée doit présenter une couverture de la séquence du Nb d'intérêt d'au moins 97% (la couverture de la séquence représente le nombre d'acides aminés des deux protéines) et une identité de séquence protéique d'au moins 66%. De plus, les mutations ou les *gaps* potentiels ne doivent en aucun cas se situer au niveau des CDR du Nb, zone de reconnaissance de l'antigène. Pour le Nb 23, quinze protéines matrices potentielles ont été identifiées. Huit d'entre elles, celles présentant les meilleures couvertures et identités de séquence protéique avec le Nb 23, ont été utilisées comme matrice pour la modélisation du Nb 23 par Swissmodel (figure 6.11). Ce programme génère deux variables permettant de mesurer la validité du modèle proposé. La qualité du modèle se traduit par des valeurs de GMQE (*Global Model Quality Estimation*) et

Template	Identité de séquence	Oligo-state	Méthode	Résolution	Couverture	Description	GMQE	QMEAN	Validité du modèle
1xfp.1.A	69.23	hetero-oligomer	X-ray	1.50Å	0.99	heavy chain antibody	0.77	-2.71	✔
1jtt.1.A	68.46	hetero-oligomer	X-ray	2.10Å	0.99	Vh Single-Domain Antibody	0.78	-2.79	✔
1jtp.1.A	68.46	hetero-oligomer	X-ray	1.90Å	0.99	Single-Domain Antibody	0.76	-3.11	✗
1jto.2.A	68.46	hetero-oligomer	X-ray	2.50Å	0.99	Vh Single-Domain Antibody	0.74	-4.35	✗
1mel.1.A	68.46	hetero-oligomer	X-ray	2.50Å	0.99	Vh Single-Domain Antibody	0.74	-4.21	✗
1mel.2.A	68.46	hetero-oligomer	X-ray	2.50Å	0.99	Vh Single-Domain Antibody	0.75	-3.79	✗
4kro.1.B	67.97	hetero-oligomer	X-ray	3.05Å	0.98	Nanobody/VHH domain EgA1	0.69	-5.61	✗
4krn.1.A	67.97	monomer	X-ray	1.55Å	0.98	Nanobody/VHH domain EgA1	0.75	-2.36	✔

Figure 6.11. Liste des 8 protéines matrices sélectionnées pour la modélisation du Nb 23 via le site internet Swiss-model (swissmodel.expasy.org) avec les valeurs du GMQE et de QMEAN permettant d'établir la validité et la fiabilité du modèle du Nb23. Plus les valeurs de GMQE sont proches de 1 et le QMEAN proche de 0, plus le modèle est probable. Les modèles dont la valeur de QMEAN est inférieure à -3.0 sont considérés comme non probables.

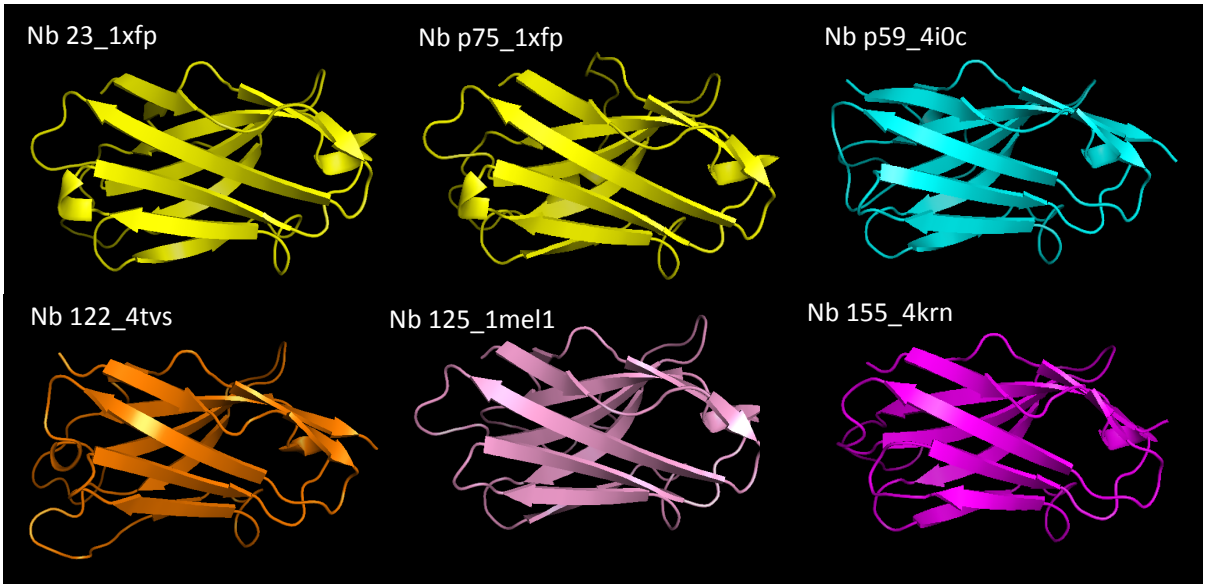


Figure 6.12. Représentation des modélisations de 6 Nb de 5 familles différentes réalisées grâce au site internet Swissmodel (swissmodel.expasy.org) en se basant sur cinq protéines matrice différentes dont le nom du fichier pdb est indiqué à coté du Nb modélisé.

de QMEAN. La valeur de GMQE est une mesure qualitative basée sur la combinaison de paramètres issus de l'alignement de séquence entre la protéine matrice et la protéine d'intérêt. Le QMEAN est une fonction numérique capable d'intégrer les erreurs globales (au niveau de la structure entière) et les erreurs locales (au niveau de chaque résidu) estimées à partir d'un modèle unique. Il prend en compte six paramètres tels que la torsion des résidus, la solvatation ou les contraintes liées à la structure secondaire (Benkert *et al.,* 2009) pour évaluer la qualité d'un modèle. Plus le GMQE est proche de 1 et la valeur de QMEAN proche de 0, plus le modèle est probable et de bonne qualité. Sur les huit protéines matrices sélectionnées, seuls les trois modèles issus des matrices 1xfp, 1jtt et 4krs semblent effectivement probables (figure 6.11). Le modèle issu de la matrice 1xfp (cAb-Lys3 VHH ; De Genst *et al.,* 2004) présentant la meilleure valeur de QMEAN et la plus forte identité de séquence avec le Nb 23, a donc été retenu comme modèle du Nb 23.

J'ai procédé de la même façon pour les quatre autres Nb (p59, 122, 125 et 155) et les résultats de modélisation sont présentés dans la figure 6.12. Les Nb 23 et p75 appartenant à la même famille de Nb et présentant une identité de séquence de 89%, il était logique que la même protéine (1xfp) serve de matrice pour ces deux Nb. En revanche, les Nb p59, 122, 125 et 155 ont été modélisés selon des protéines matrices différentes, à savoir celles du fichier PDB 4i0C (camelid antibody cAbHuL5, De Genst *et al.,* 2013) pour le Nb p59; 4tvs (VHH-BS1, Sosa et Schwartz, 2014) pour le Nb 122, 1mel1 (VHH, Desmyter *et al.,* 1997) pour le Nb 125 et 4krn (VHH EgA1, Ferguson et Schmitz, 2013) pour le Nb 155.

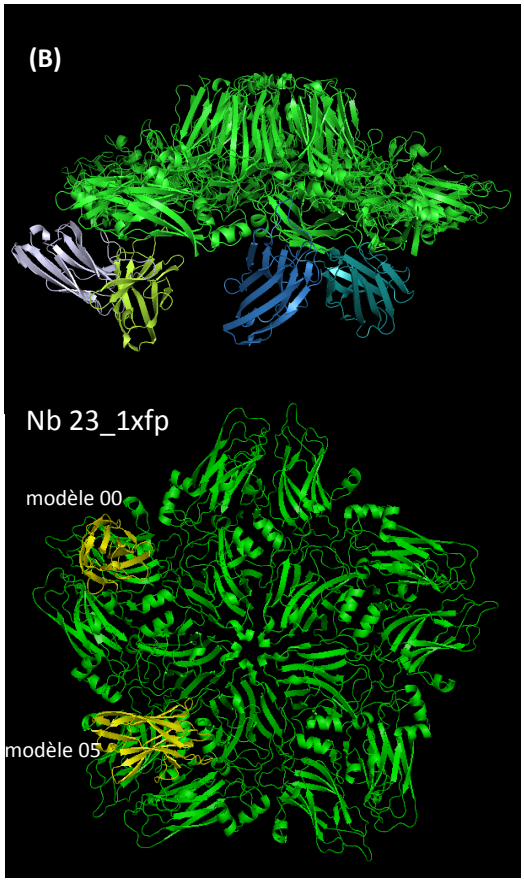
3. *Docking* des Nb sur le pentamère de la protéine de capside du GFLV-F13

Afin de valider l'utilisation du logiciel ClusPro (Comeau *et al.,* 2004) pour la prédiction d'interaction entre protéines, j'ai d'abord identifié les résidus de la CP interagissant avec le Nb 23 défini par ce programme. J'ai ensuite comparé ces résidus à ceux caractérisés par cryo-EM, et ainsi vérifié la corrélation entre ces deux résultats. Afin d'augmenter la probabilité d'identification de l'épitope reconnu et pour pouvoir identifier des Nb pouvant également se fixer sur les axes de symétrie 2, 3 ou 5 de la capside virale, j'ai choisi d'effectuer les recherches non pas sur le monomère de la CP mais sur son pentamère, le logiciel ClusPro ne pouvant pas prendre en compte le fichier du virus complet à cause de sa grande taille. La prédiction du site d'interaction du Nb 23 sur le pentamère de la capside du GFLV par le programme ClusPro a été réalisée avec le fichier pdb 23_model1xfp

(A)

Cluster	Members	Representative	Weighted Score	Docking region	CP residus involved	Model
0	75	Center	-838.5	outside	14	0
		Lowest Energy	-913.5			
1	44	Center	-767.5	outside	16	0
		Lowest Energy	-882.2			
2	42	Center	-791.8	outside	11	0
		Lowest Energy	-856.7			
3	39	Center	-836.2	outside	16	0
		Lowest Energy	-854.3			
4	38	Center	-826.4	outside	13	0
		Lowest Energy	-868.3			
5	26	Center	-812.5	outside	16	5
		Lowest Energy	-840.9			
6	25	Center	-761.7	outside	14	5
		Lowest Energy	-848.3			
7	22	Center	-814.7	inside	-	-
		Lowest Energy	-814.7			
8	21	Center	-848.3	inside	-	-
		Lowest Energy	-848.3			
9	21	Center	-774.3	outside	15	5
		Lowest Energy	-834.5			
10	20	Center	-819.4	inside	-	-
		Lowest Energy	-819.4			
11	20	Center	-759.8	outside	14	5
		Lowest Energy	-812.3			
12	20	Center	-737.5	inside	-	-
		Lowest Energy	-805.4			
13	19	Center	-819	inside	-	-
		Lowest Energy	-819			
14	19	Center	-816.7	inside	-	-
		Lowest Energy	-816.7			
15	18	Center	-809.8	inside	-	-
		Lowest Energy	-809.8			
16	17	Center	-778.3	inside	-	-
		Lowest Energy	-778.3			
17	16	Center	-806.1	inside	-	-
		Lowest Energy	-806.1			
18	15	Center	-796.4	inside	-	-
		Lowest Energy	-796.4			
19	15	Center	-768.4	outside	16	5
		Lowest Energy	-803.6			
20	15	Center	-756	inside	-	-
		Lowest Energy	-800.5			
21	14	Center	-796.4	outside	15	5
		Lowest Energy	-866			
22	14	Center	-803.2	inside	-	-
		Lowest Energy	-803.2			
23	14	Center	-798	outside	15	0
		Lowest Energy	-798			
24	14	Center	-775.9	inside	-	-
		Lowest Energy	-775.9			
25	13	Center	-798.3	outside	13	0
		Lowest Energy	-798.3			
26	11	Center	-806.3	inside	-	-
		Lowest Energy	-806.3			
27	11	Center	-794.4	inside	-	-
		Lowest Energy	-794.4			
28	10	Center	-815.8	inside	-	-
		Lowest Energy	-815.8			
29	10	Center	-782.7	inside	-	-
		Lowest Energy	-782.7			

(B)



(C)

modèle 05

Résidus CP d'interaction	Position séquence
R	79
T	212
T	213
K	214
R	368
D	371
F	372
T	373
N	375
R	378
S	380
M	382
E	383
N	461
F	502
V	504

modèle 00

Résidus CP d'interaction	Position séquence
D	85
L	197
R	198
S	199
G	201
M	209
G	211
G	297
Q	298
S	299
Q	300
R	301
D	302

Figure 6.13. (A) Tableau représentant les différents modèles obtenus pour le *docking* du Nb 23 et du pentamère du GFLV-F13 par le programme ClusPro (*https://*cluspro.bu.edu). Le nombre de membre représente le nombre de fois où l'interaction a été estimée comme probable. L'énergie indique la force de l'interaction : plus cette énergie est négative plus l'interaction est forte et donc probable **(B)** Représentation en ruban d'un pentamère du GFLV-F13 (en vert) en interaction avec les Nb (gris, vert clair, bleu foncé, bleu clair) se fixant au niveau des résidus exposés à la face interne de la capside ou avec les Nb (en jaune) en interaction avec les résidus exposés à la surface externe de la capside virale (modèles 00 et 05) **(C)** Les résidus de la capside impliqués dans cette interaction sont décrits dans les tableaux de chaque modèle. Les cases rouges foncées correspondent aux résidus caractérisés comme étant impliqués dans l'interaction Nb 23/CP par cryo-EM et ceux en rouge plus clair correspondent aux résidus présents dans la zone d'interaction, couvert par l'empreinte totale du Nb 23.

correspondant à la modélisation du Nb 23, et celui du pentamère de la CP du GFLV-F13 issu du fichier pdb 4V5T/2Y7T (Schellenberger *et al.,* 2011). Le Nb 23 a été soumis en tant que « ligand » et le pentamère de GFLV-F13 en tant que « récepteur ». Le programme ClusPro permet d'établir les modèles potentiels d'interactions protéiques en se basant sur des algorithmes qui évaluent les complémentarités de surface favorables entre deux protéines. Les résultats sont filtrés en sélectionnant les modèles présentant les meilleures énergies électrostatiques. Vingt-neuf modèles hypothétiques ont ainsi été générés (figure 6.13.A). Les clusters représentent les différents modèles obtenus, dont le nombre de membres représente le nombre de fois où l'interaction a été estimée comme probable pour chaque modèle. L'énergie établie la force de l'interaction : plus cette énergie est négative plus l'interaction entre résidus est forte et donc probable.

Chaque modèle a été analysé grâce au logiciel Pymol (DeLano, 2002). J'ai d'abord éliminé les modèles pour lesquels l'épitope prédit n'était pas présent à la surface externe de la capside virale. En effet, comme observé en DLS ou en ELISA, les Nb se fixent sur une particule virale complète où seuls les résidus de surface externes sont accessibles (figure 6.13.B). Dix-sept modèles ont ainsi été éliminés et treize modèles potentiels ont été identifiés comme montrant une interaction entre le Nb 23 et des résidus de surface externe de la capside virale (figure 6.13.A). Les résidus de la protéine de capside en l'interaction avec les Nb 23 ont été identifiés grâce au logiciel Pymol et comprennent les résidus distants de moins de 3Å. Les modèles ont ainsi pu être classés en deux groupes distincts, sur la base de résidus communs. Un modèle représentatif de chaque groupe a été choisi (modèle 00 et modèle 05), car ils présentent les meilleures énergies. Les deux modèles d'interaction sont représentés figure 6.13.B et les résidus de la CP interagissant avec le Nb 23 sont décrits dans les deux tableaux de cette même figure (figure 6.13.C). D'après les données obtenues par cryo-EM (Hemmer *et al.,* 2016), l'interaction Nb/virus implique les CDR 2 et 3 du Nb 23 et deux zones principales de la protéine de capside du GFLV-F13. La zone 1 comprend les résidus 212 à 216 de la région βC'' du domaine B de la CP et la zone 2 les résidus 370-391 du domaine A de la CP. Dans ces deux zones, seuls les résidus 212, 214 et 216 d'une part, et les résidus 371, 375, 379, 380 et 381 d'autre part, interagissent effectivement avec le Nb 23. À ces deux zones s'ajoute aussi un troisième point d'ancrage, impliquant les résidus 502 et 504. Il s'avère que sur les 16 résidus identifiés pour le modèle d'interaction 05, 7 résidus sont effectivement impliqués dans l'interaction du Nb 23 avec la CP (indiqué en rouge foncé figure 6.13.C) et 6 sont effectivement présent dans les zones d'interaction décrites

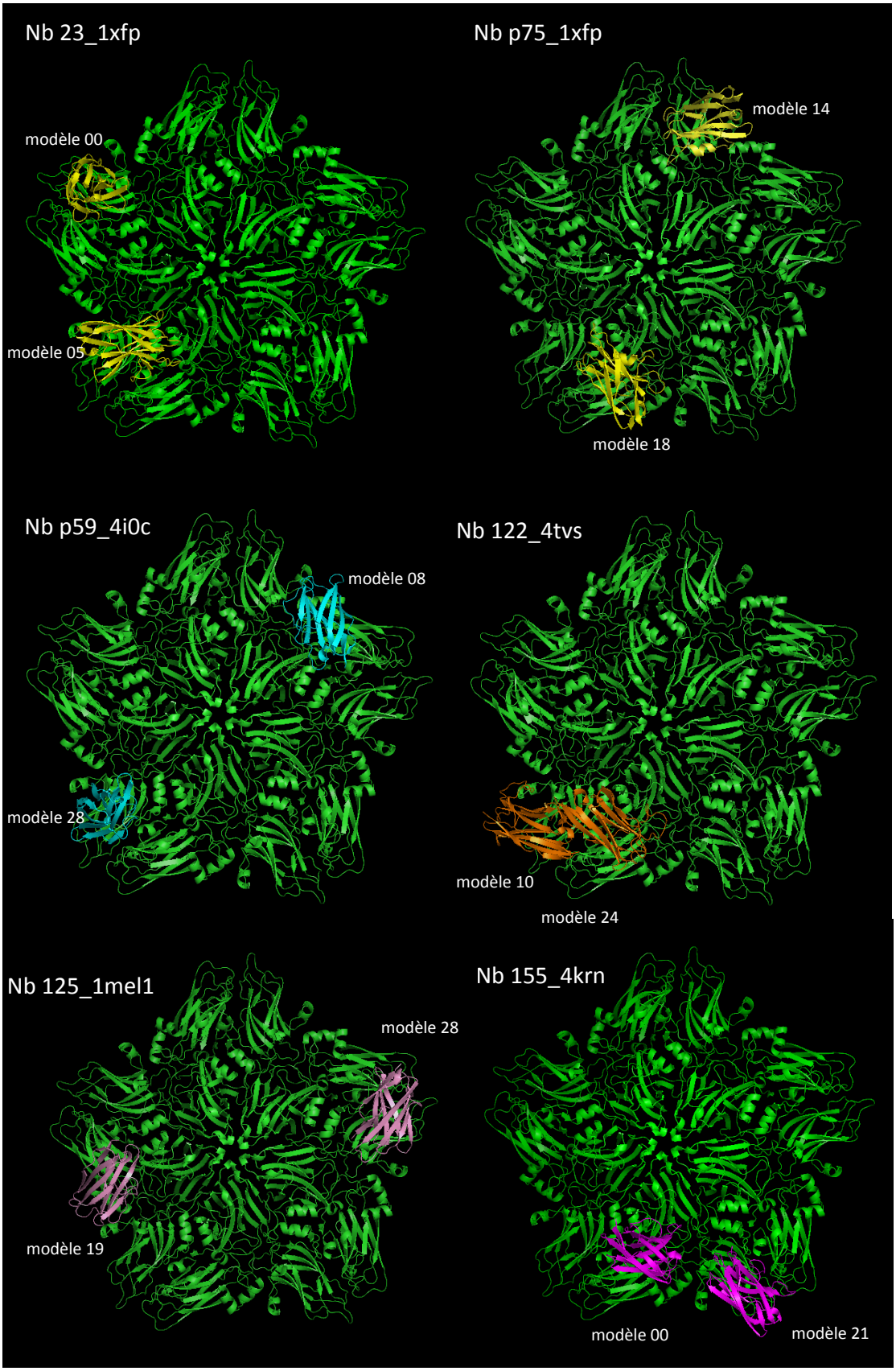


Figure 6.14. Représentation en ruban des modèles d'interaction issus du *docking* des Nb 23, p75, p59, 125, 122 et 155 avec le pentamère de CP du GFLV-F13 (en vert). Pour chaque Nb sont indiqués les modèles les plus probables obtenus grâce au programme ClusPro (*https://* cluspro.bu.edu)

	Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position
p75	M	430	p59	C	184	122	K	121	125	N	16	155	K	121
modèle 14	L	197	modèle 08	P	186	modèle 10	N	17	modèle 28	R	17	modèle 21	T	192
	R	198		F	188		S	83		S	83		A	193
	S	199		F	189		D	85		D	85		V	194
	Q	206		D	190		F	188		P	186		T	195
	M	209		L	197		D	190		I	187		A	196
	T	212		R	198		T	192		F	188		L	197
	K	214		S	199		L	195		R	198		R	198
	W	255		G	201		R	197		G	211		S	199
	N	256		Q	206		S	198		T	212		N	256
	T	258		M	209		R	199		G	257		G	257
	R	293		G	211		M	209		T	258		T	258
	G	297		T	212		G	211		G	297		T	259
	Q	298		K	214		W	255		Q	298		M	260
	S	299		T	258		N	256		S	299		D	261
	Q	300		Q	298		T	258		Q	300		W	262
	R	301		Q	300		T	259		D	302		N	263
	D	302		R	301		M	260		S	305		G	297
				Q	323		W	262		N	307		S	298
							S	299		Q	323		R	301
							Q	300					D	302
							R	301						
							Q	323						

	Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position		Résidus CP	Position
p75	A	429	p59	R	26	122	S	78	125	T	22	155	R	79
modèle 18	S	78	modèle 28	D	27	modèle 24	R	79	modèle 19	R	26	modèle 00	K	360
	R	79		N	74		K	214		D	27		E	364
	T	212		S	78		R	293		N	74		R	368
	K	214		R	79		K	355		S	78		D	371
	R	293		K	121		E	360		T	81		F	372
	L	358		F	125		E	361		W	119		T	373
	E	361		E	126		E	364		K	121		S	374
	E	362		R	128		D	371		S	122		N	375
	E	364		N	256		F	372		T	123		C	377
	R	368		T	258		T	373		F	125		R	378
	D	371		Y	287		N	375		E	126		V	379
	T	373		Y	287		T	376		S	127		S	380
	S	374		D	302		R	378		R	129		N	461
	N	375		R	368		V	379		R	368		R	463
	T	376		D	371		S	380		D	371		F	502
	R	378		T	373		M	381		N	375			
	E	383		N	375		R	463		T	462			
	N	461		N	461		W	470		R	463			
	T	462		R	463		R	485		S	465			
	R	463		S	465					P	492			
	P	504								F	502			

Figure 6.15. Tableaux récapitulatifs des résidus de la capside impliqués dans les interactions Nb/CP d'après les résultats de *docking* issus du site ClusPro et de l'analyse par le logiciel Pymol, pour les différents Nb testés (Nb p75, p59, 122, 125 et 155). Les résidus colorés en bleu et orange montrent deux cluster de résidus communs présents pour les différents Nb. En vert sont indiqués les résidus communs ou proches des modèles p59 et 125 absents des autres modèles présentés.

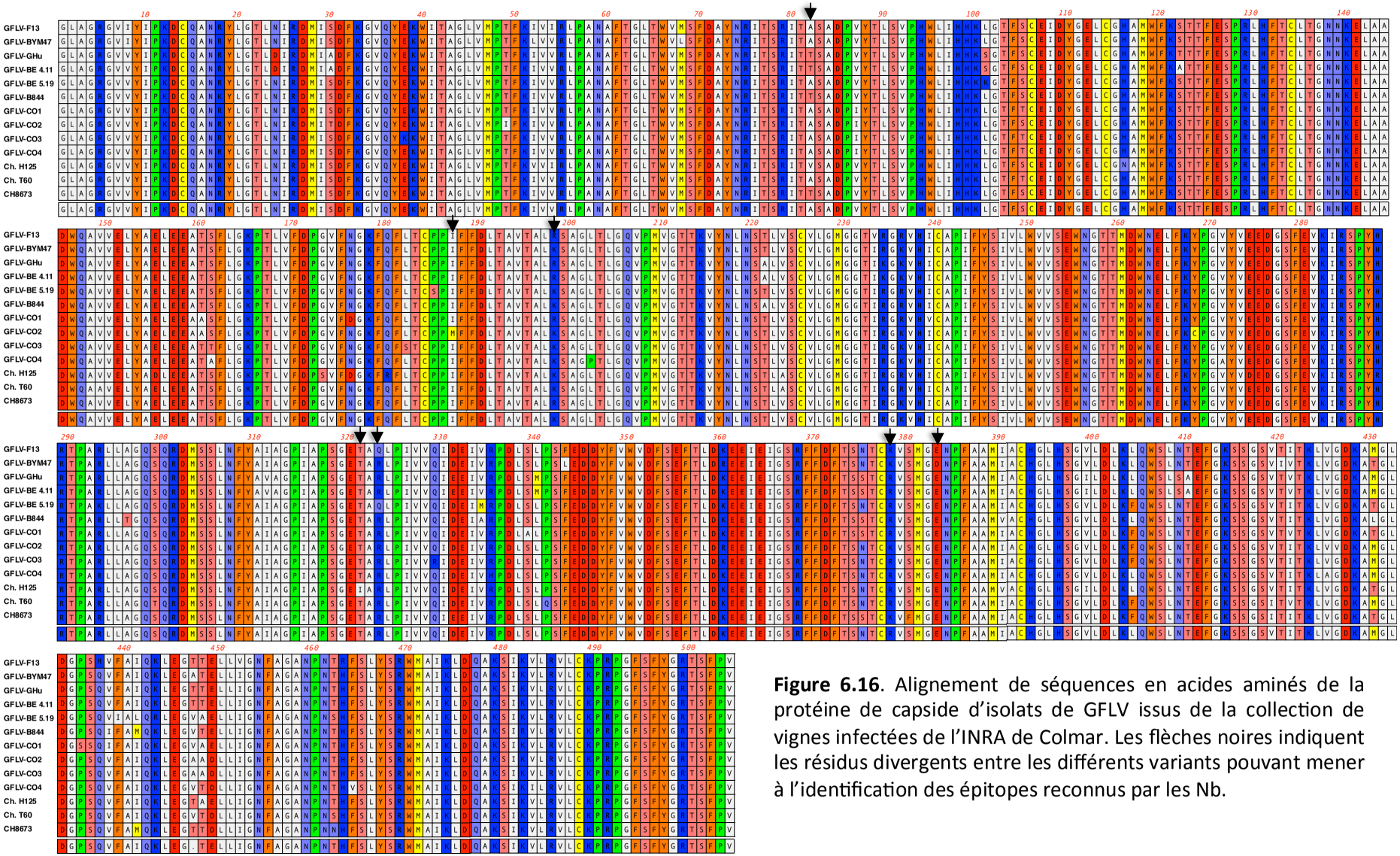


Figure 6.16. Alignement de séquences en acides aminés de la protéine de capside d'isolats de GFLV issus de la collection de vignes infectées de l'INRA de Colmar. Les flèches noires indiquent les résidus divergents entre les différents variants pouvant mener à l'identification des épitopes reconnus par les Nb.

précédemment (en rouge clair figure 6.13.C), montrant le modèle 05 comme étant proche des données expérimentales. Le modèle 00 ne présente quant à lui aucun résidu commun avec ceux identifiés par cryo-EM.

Les résultats de prédiction d'épitope ayant donnés satisfaction pour un des deux modèles impliquant le Nb 23, j'ai donc procédé de la même façon pour la prédiction des interactions des Nb p59, 122, 125 et 155 et du pentamère de CP de GFLV-F13. Dans tous les cas, deux modèles majoritaires ressortaient de l'analyse ClusPro (figure 6.14.), convergeant tous vers une reconnaissance des mêmes résidus (décrits dans les tableaux figure 6.15), à savoir soit les acides aminés en position 371 à 383 de la CP (surlignés en orange figure 6.15) pour les Nb p75_modèle18, 122_modèle24, 155_modèle00, soit les résidus en positions 184 à 214 (surlignés en bleu figure 6.15) pour les Nb p59_modèle08, 122_modèle10, 125_modèle28 et 155_modèle21. Seuls deux modèles ressortaient comme étant légèrement différents des autres, les modèles p59_modèle28 et 125_modèle19, qui présentent une reconnaissance commune d'un motif entre les positions 121 et 129 de la CP (surlignés en vert figure 6.15) en plus des résidus 371 à 383. Ces deux derniers modèles suggèrent la reconnaissance d'un épitope chevauchant entre les Nb p59 et 125. L'obtention de modèles similaires pour les différents Nb, et donc une reconnaissance d'épitope communs par plusieurs Nb de différentes familles me semblaient peu probable, compte tenu des différences de spectre de reconnaissance des isolats de GFLV observées pour ces Nb, qui laissait présager une reconnaissance d'épitopes différents. J'ai donc poursuivi la caractérisation de ces épitopes sur la base d'analyses de données expérimentales.

V. Identification d'épitopes reconnus par les Nb par analyse de données biologiques

Les prédictions réalisées *in silico* n'ayant pas permis d'identifier les épitopes reconnus par les Nb, j'ai cherché à les caractériser expérimentalement. Pour cela, j'ai d'une part cartographié les variations de résidus de surface à partir de CP provenant de différents isolats de GFLV de la collection de l'INRA de Colmar (figure 6.16) et d'autre part procédé à des ELISA compétitifs afin de déterminer la capacité de différents Nb testés deux à deux à entrer en compétition pour un même épitope. Les alignements de séquences réalisés ont permis d'identifier des résidus divergents pour les différents isolats de GFLV pouvant expliquer une

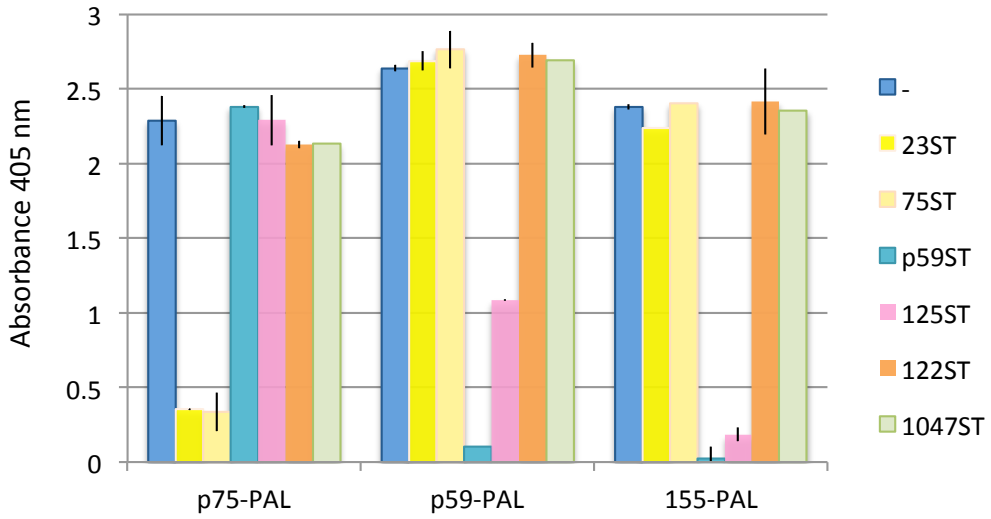


Figure 6.17. ELISA compétitif contre du GFLV-F13 purifié, directement adsorbé sur la plaque ELISA. La présence de particules virales est révélée grâce aux différents Nb-PAL dilués au 1 :500 seuls, ou associés aux Nb-ST également dilués dans le tampon conjugués au 1:100. La fixation des NbST à la surface de la particule virale ne confère aucun signal en ELISA et peu potentiellement gêner la fixation des Nb-PAL, réduisant le signal du test.

perte ou une diminution de la reconnaissance dudit isolat par un Nb donné (indiqué par une flèche noire figure 6.16).

1. Tests ELISA compétitifs contre le GFLV-F13 purifié

Afin de tester la possible reconnaissance d'épitopes communs par les Nb, j'ai réalisé un ELISA compétitif contre du GFLV-F13 purifié (figure 6.17). Lors de ce test, les particules virales de GFLV purifiées sont directement adsorbées sur la plaque ELISA et la présence de particules virales est révélée grâce aux différents Nb-PAL dilués au 1:500 (p75, p59 et 155). Lors de la phase de détection du test, le tampon conjugué contenant les Nb-PAL a été additionné ou non de différents Nb-ST dilués au 1:100 (23, 75 p59, 125, 122 et 3082) soit largement en excès par rapport aux Nb-PAL. La fixation d'un Nb-ST donné à la surface de la particule virale ne conférant aucun signal en ELISA contrairement aux Nb-PAL, une diminution d'absorbance observée en présence dudit Nb-ST par rapport au témoin Nb-PAL sans Nb-ST est signe de compétition.

L'analyse des tests montre que les différents Nb-ST entrent tous en compétition avec leurs homologues Nb-PAL respectifs (figure 6.17), validant l'approche d'ELISA compétitif. De la même manière, le Nb 23-ST entre en compétition avec le Nb p75-PAL, indiquant que ce Nb reconnait un épitope partiellement ou totalement commun à la surface de la capside virale. Ceci n'est pas une surprise puisque les Nb p75 et 23 appartiennent à la même famille de Nb et qu'il est généralement admis que les Nb d'une même famille reconnaissent le même épitope. Sur le même principe, j'ai ainsi pu établir que les paires Nb p59 et 125, Nb p59 et 155 ainsi que les Nb 125 et 155 entrent en compétition, montrant que les Nb p59, 122 et 125 semblent donc partager un épitope commun. En revanche, aucune compétition n'a été constatée entre le Nb p75-PAL et les Nb p59, 125 et 122, ni entre le Nb p59-PAL et les Nb 23, p75 et 122, ni entre le Nb 155-PAL et les Nb 23, p75 et 122. Le Nb 1047, un Nb anti-ArMV, n'entre en compétition avec aucun des Nb anti-GFLV (p75, p59 ni 155) ce qui semble logique puisque ce Nb anti-ArMV ne reconnait pas le GFLV. Trois épitopes distincts semblaient donc être reconnus par les Nb : un premier par les Nb 23 et p75, un deuxième par les Nb p59, 125 et 155 et un autre par le Nb 122.

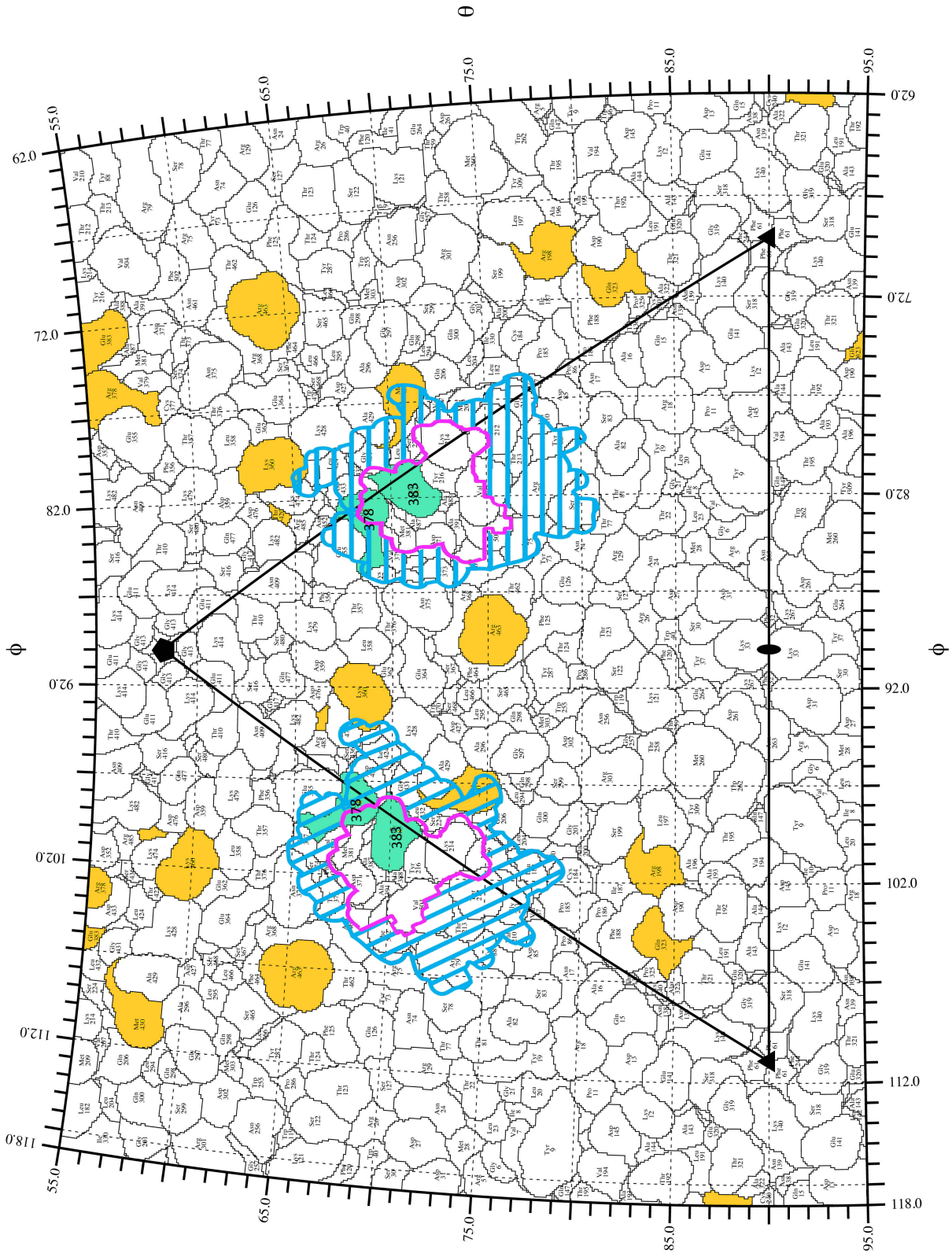


Figure 6.18. Représentation 2D de la capside du GFLV par RIVEM avec en magenta la région de la capside en interaction avec le Nb 23 et en cyan, l'empreinte globale du Nb 23 sur la capside du GFLV. Ces deux régions ont été définies à partir de la structure atomique à 2,8 A identifiée en résolue par cryo-EM. En jaune sont indiqués la position des résidus divergents entre les isolats GFLV-F13 et GFLV-BYM47 et en vert, ceux pouvant expliquer la diminution de reconnaissance de cet isolat par le Nb 23.

Pour vérifier ces informations, j'ai analysé en détail le spectre de reconnaissance des Nb p75 p59, 125 et 155 en ELISA hybride et cartographié les variations de résidus de surface à partir de CP provenant de différents isolats de GFLV de la collection de l'INRA de Colmar afin d'identifier les mutations susceptibles d'expliquer les pertes ou les diminutions de reconnaissance de certains isolats par les Nb.

2. Identification d'épitopes grâce à l'analyse du spectre de reconnaissance des Nb et à la comparaison de séquence de la protéine de capside d'isolats de GFLV

A. Épitope reconnu par les Nb 23 et p75

Lors des tests hybrides réalisés avec le Nb 23-ST et le Nb p75-ST, seul l'échantillon GFLV-BYM47 n'avait pas été reconnu par ces deux Nb de la famille majoritaire (figure 4.7). Lors du test hybride avec le Nb p75-PAL, ce Nb permettait une reconnaissance faible de cet isolat viral (figure 4.28). Comme ceci pouvait contribuer à la compréhension de l'épitope reconnu par les Nb de la famille majoritaire, l'isolat BYM47 a été séquencé. Cet isolat présente 98,4% d'identité de séquence avec le GFLV-F13 avec seulement 8 acides aminés de divergence en surface de la CP. Ces acides aminés sont représentés en jaune figure 6.18 sur une carte RIVEM qui permet de visualiser une projection 2D des résidus d'une capside virale (Xiao et Rossmann, 2007). Sur cette carte sont indiqués les axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 respectivement par un ovale, un triangle et un pentamère noirs. En magenta est détourée l'épitope reconnu par le Nb 23 sur la base des données structurales obtenues par cryo-EM. En bleu est indiqué la projection du Nb 23 sur la surface de la capside virale, correspondant à l'encombrement que celui-ci peut générer sur la particule virale. L'analyse de la superposition de l'empreinte du Nb 23 et des résidus divergents entre le GFLV-BYM47 et le GFLV-F13 souligne clairement l'implication de deux résidus, à savoir les résidus 378 et 383 (indiqués en vert dans la figure 6.18) car situés précisément au niveau de l'épitope du Nb23 (ligne magenta) et donc très probablement à l'origine de la diminution de reconnaissance du Nb 23 pour ce variant.

Selon ce même raisonnement, j'ai recherché les isolats viraux de GFLV conférant une perte ou une diminution de reconnaissance par les Nb, afin d'élucider les épitopes reconnus.

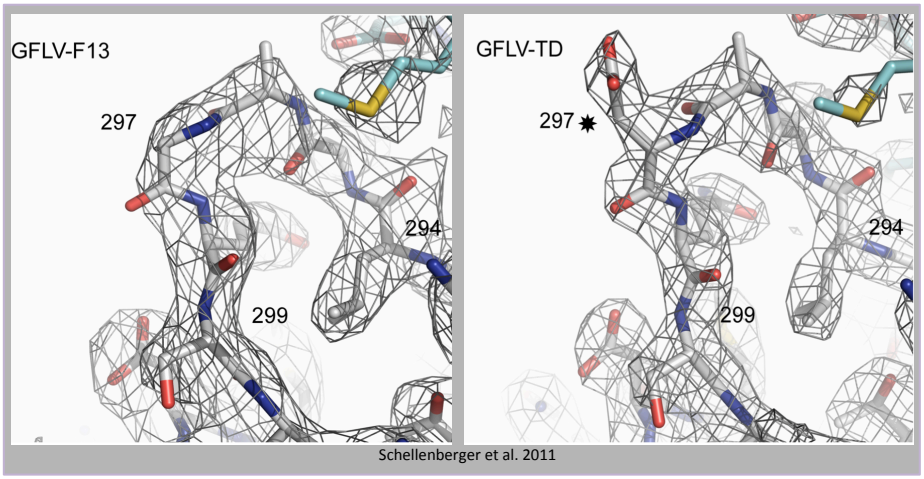


Figure 6.19. Représentation en bâtonnets et densités électroniques des résidus de la de la boucle βG-βH du GFLV-F13 et du GFLV-TD. L'isolat GFLV-TD se caractérise par une unique mutation à la surface de la capside virale, à savoir le remplacement de l'acide aminé glycine en position 297 par un résidu d'acide aspartique chargé négativement. Cette unique mutation ne conduit à aucune modification structurale autre que l'ajout d'une densité électronique correspondant à la chaine latérale de l'acide aspartique.

B. Épitope reconnu par le Nb 122

L'isolat GFLV-TD se caractérise par une mutation unique à la surface de la capside virale du GFLV-F13, à savoir le remplacement d'une glycine en position 297 par un résidu aspartate chargé négativement (figure 6.19). Cette unique mutation, qui ne conduit à aucune modification structurale autre que l'ajout d'une densité électronique correspondant à la chaine latérale de l'acide aspartique (Schellenberger *et al.,* 2011), est néanmoins suffisante pour entrainer une perte totale de reconnaissance de ce variant par le Nb 122. Cette non-reconnaissance a été aussi bien établie par DLS que par DAS-ELISA (figure 6.6) et suggère que le résidu 297 est fortement impliqué dans l'interaction entre le Nb 122 et le GFLV. Ces résultats situent donc l'épitope reconnu par ce Nb dans une région à proximité du résidu 297 comme indiqué par un cercle brun figure 6.20. Aucun des modèles de prédiction *in silico* n'a pu être corrélé à ces donnés biologiques.

C. Épitope reconnu par les Nb p59, 155 et 125

Les ELISA compétitifs ont montré que les Nb p59, 125 et 155 semblent reconnaître un épitope partiellement ou totalement commun. Sur le même principe que précédemment j'ai recherché des isolats non reconnus par ces Nb et séquencés au niveau du gène $2C^{CP}$, afin d'identifier les résidus de surfaces divergents pouvant expliquer la perte de reconnaissance de ces isolats.

(i) Nb p59

Le Nb p59, comme tous les Nb de la famille 2, ne reconnaît pas un variant chimère du GFLV, appelé GFLV-G2, pour lequel les résidus 188 à 198 ont été remplacés par leurs homologues ArMV (Schellenberger *et al.,* 2010) aussi bien en PE-ELISA (thèse de Caroline Hemmer, 2015) qu'en DAS-ELISA avec le Nb p59-ST (résultats non montrés). Cette région G2 semble donc impliquée dans le site de reconnaissance du Nb p59 à la surface de la capside du GFLV. Les résidus divergents entre la CP du GFLV-F13 et du GFLV-G2 sont indiqués en bleu clair figure 6.20. Par ailleurs, le Np59-PAL permet la détection de tous les isolats de GLFV naturels testés à partir de vignes infectées, à l'exception de l'isolat GFLV-Ch. H125. Cet isolat comporte seulement quatre résidus de surface divergent du GFLV-F13 (une valine en position 82, une isoleucine en position 321, une arginine en position 323 et une thréonine en position 430).

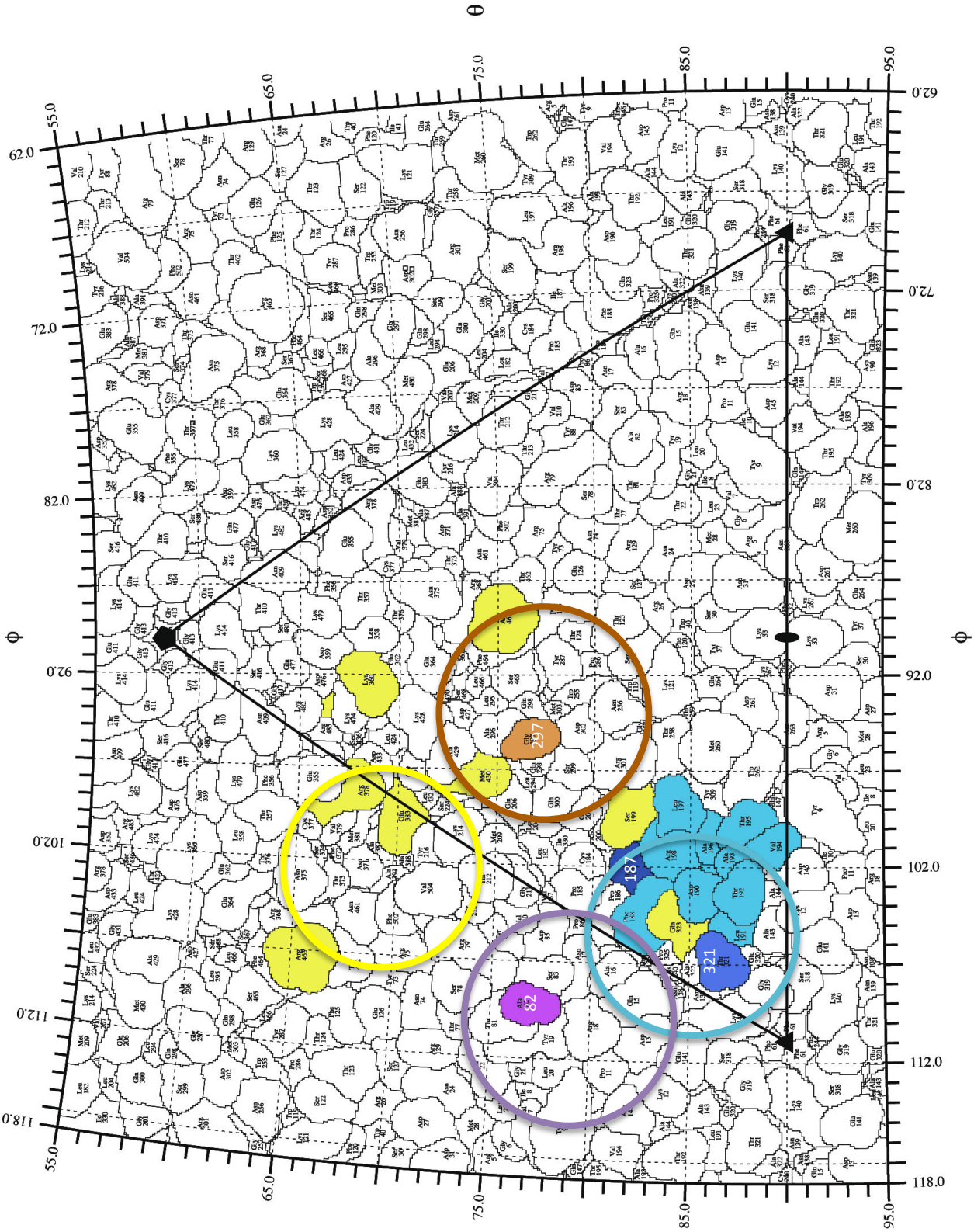


Figure 6.20. Localisation potentielle des épitopes des Nb p59, p75, 122 et 155 sur la représentation 2D de la capside du GFLV par RIVEM. Les résidus colorés correspondent aux résidus divergents d'isolats de GFLV par rapport au GFLV-F13, pouvant expliquer la perte ou la diminution d'affinité des Nb pour ces isolats. En jaune sont les résidus divergents de l'isolat GFLV-BYM47, en orange le résidus divergent du GFLV-TD. En bleu clair sont indiqués les résidus de la région R2, et en bleu moyen et en bleu plus foncé, sont indiqués deux résidus des isolats Ch. H125 et C02 pouvant être impliqués dans la perte et la diminution de la reconnaissance de ces isolats par le Nb p59. En violet est indiqué le résidu divergent des isolats GHu, CF 844 et Ch. 125 pouvant être impliqué dans la perte et la diminution de la reconnaissance de ces isolats par le Nb 155. Les cercles de couleur représentent les sites de fixation potentiels du Nb p75 (en jaune), du Nb 122 (en brun), du Nb 155 (en violet) et du Nb p59 (bleu).

Le résidu en position 321 est divergent par rapport aux onze autres les isolats de GFLV séquencés, à savoir une isoleucine au lieu d'une thréonine, indiqué figure 6.20 en bleu moyen. Ce résidu est directement adjacent à la région G2, confirmant l'importance de cette zone dans la reconnaissance Nb p59/GFLV-F13. Enfin, le Nb p59-PAL ne reconnaît que moyennement l'isolat GFLV-C02. Cet isolat comporte un résidu divergent en position 187 (une méthionine à la place d'une isoleucine) également en bordure immédiate de la région G2 (indiqué en bleu foncé figure 6.20).

Lors du test hybride (figure 4.7), le Nb p59-ST ne permettait pas la détection de l'isolat GFLV-BYM47. L'isolat GFLV-BYM47 présente des divergences au niveau des résidus 199 et 323 situés également au abord de la région G2 (indiqué en jaune dans la figure 6.20) pouvant expliquer que ce variant ne soit pas reconnu par le Nb p59-ST. L'analyse du spectre du Nb p59-PAL a également montré que ce Nb ne reconnaît que très peu l'isolat GFLV-Lavallée. Cet isolat est en cours de séquençage et pourrait apporter une information supplémentaire quant au site de fixation du Nb p59. Dans tous les cas, sur la base des analyses des isolats GFLV-G2, Ch. H125, GFLV-CO2 et GFLV-BYM47 qui est cohérente, l'épitope reconnu par le Nb p59 semble se situer au niveau de la région délimitée par un cercle bleu figure 6.20. En reprenant les modèles obtenus par le logiciel ClusPro, le modèle p59_modèle08 pourrait correspondre en partie aux résultats expérimentaux, puisque l'épitope de ce modèle comprend les résidus de contact 186, 188, 189, 190, 197, 198, 199, et 323 situés au niveau ou à proximité de la région G2 .

(ii) Nb 155

Le Nb 155-PAL ne reconnaît ni les isolats GFLV CF B844, ni GHu, ni BE 4-11 et ne détecte que très faiblement les isolats Ch. H125 et Ch.T59. Ces isolats ont été séquencés à l'exception du Ch.T59 dont l'analyse est en cours. Les isolats non reconnus partagent tous les trois la même mutation en position 82 (une thréonine à la place d'une alanine, indiqué en violet figure 6.20). Remarquablement, ce résidus 82 est aussi divergent dans l'isolat Ch. H125 mais de manière moins drastique puisque puisqu'une valine remplace une alanine, résidus appartenant au même groupe des acides aminés hydrophobes dits petits alors que la thréonine est un acide aminé petit, polaire et présente une chaine latérale hydrophile. Ceci pourrait indiquer l'importance de ce résidu dans le site de fixation du Nb 155 à la surface de la particule virale.

Lors du test hybride réalisé à l'aide de Nb-6HisST, le Nb 155 était le seul Nb identifié avec le Nb 125 à pouvoir détecter l'isolat BYM47 (chapitre 4 figure 4.7) montrant que ce variant n'impacte pas la capacité de reconnaissance de ce Nb. En superposant les résidus divergents du BYM47 (indiqués en jaune figure 6.20) avec le site potentiel de fixation du Nb 155 centré autour du résidu 82, aucun résidu divergent du BYM47 ne se trouve à proximité du site de fixation potentiel du Nb 155, suggérant que la zone identifiée pourrait effectivement correspondre à l'épitope reconnu par le Nb 155.

Dans tous les cas, sur la base des analyses des isolats GFLV-GHu, CF B844, GFLV-BYM47 et Ch. H125, l'épitope reconnu par le Nb 155 semble se situer au niveau de la région délimitée par le cercle violet centré autour du résidus Alanine 82 (figure 6.20) et ne correspond à aucun des modèles de prédiction *in silico*. Les données de séquence de l'isolat Ch. T59, faiblement reconnu par le Nb 155 et dont la caractérisation est en cours, permettront peut être d'affiner encore cette cartographie. Cet épitope est proche du site potentiel de fixation du Nb p59 et pourrait expliquer que ces deux Nb puissent effectivement entrer en compétition lors de la fixation à la surface de la capside virale, à cause de l'encombrement généré par la taille des Nb lors de leur fixation en surface de la capside.

(iii) Le Nb 125

L'épitope reconnu par le Nb 125 est plus difficile à caractériser avec exactitude car le Nb 125-PAL n'a pas pu être purifié en raison de sa trop faible production périplasmique en bactérie *E. coli.* En revanche, le spectre du Nb 125-ST a été évalué (chapitre 4, figure 4.7). L'analyse montre que ce Nb n'est pas capable de détecter les mêmes échantillons que le Nb 155 à l'exception de l'isolat H125, qui lors de ce criblage préliminaire était reconnu par le Nb 125ST. Ceci suggère que ces Nb ne reconnaissent peut être pas exactement le même épitope mais un épitope potentiellement très proche qu'il est pour le moment impossible d'identifier avec certitude.

En conclusion, l'identification d'épitopes reconnus par les différents Nb est un atout important, tant pour la caractérisation des Nb que pour une meilleure compréhension de la reconnaissance de virus émergents dans un but de diagnostic. En effet, le séquençage de virus émergents et l'analyse des résidus de surface divergents de la protéine de capside de ces variants, pourraient permettre d'évaluer leur capacité à échapper à la reconnaissance par les Nb utilisés en diagnostic. L'identification des épitopes reconnus montre également

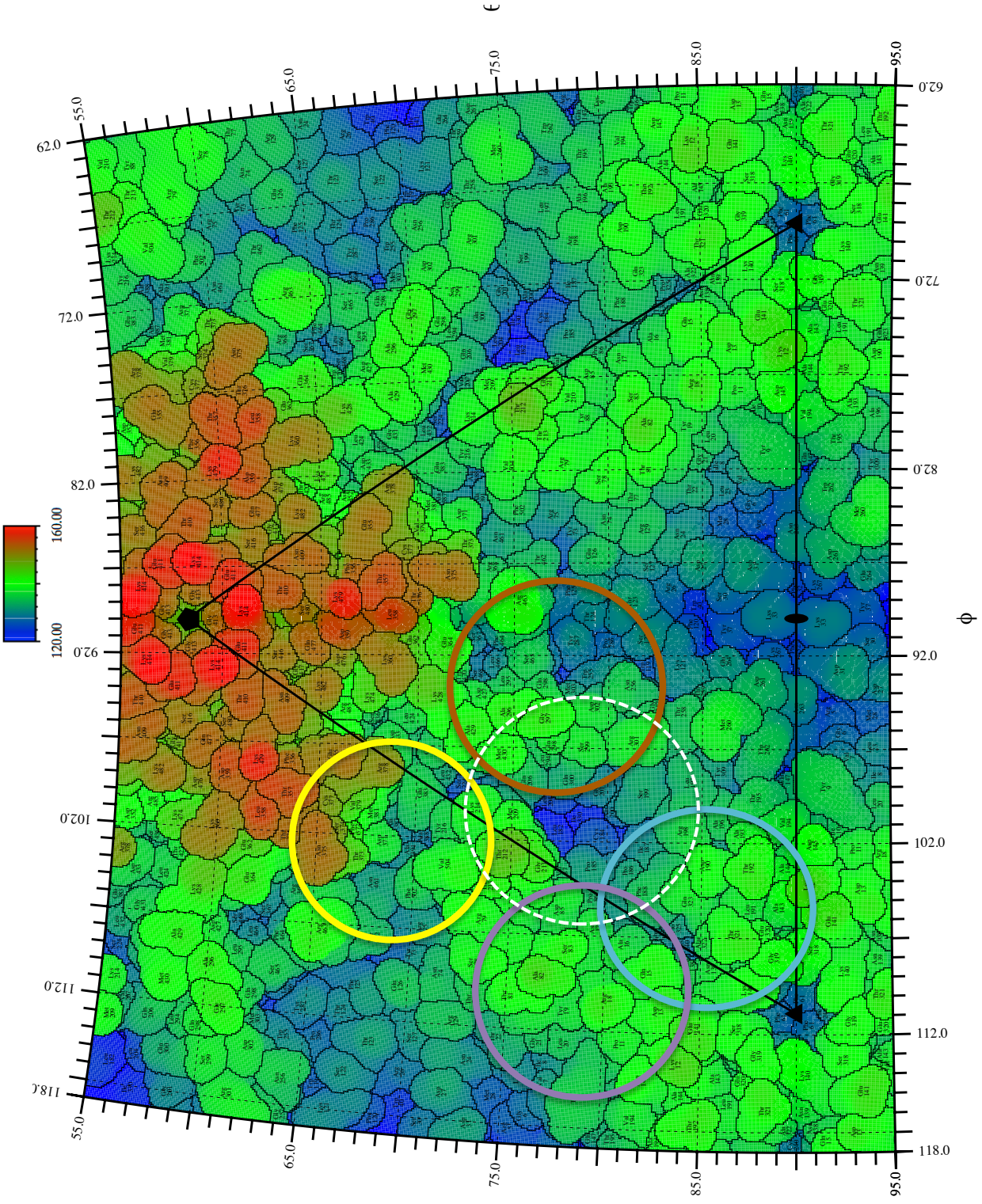


Figure 6.21. Représentation 2D de la capside du GFLV par RIVEM. Les différences de couleur indiquent les variations de profondeur de la surface de la capside virale, avec en rouge les résidus les plus proéminents, et en bleu, les résidus les plus profond. Les cercles de couleur représentent les sites de fixation potentiels du Nb p75 (en jaune), du Nb 122 (en brun), du Nb 155 (en violet) et du Nb p59 (bleu). En pointillés blancs est indiquée la cavité suspectée comme étant impliquée dans la transmission du GFLV par le nématode vecteur *X. index* (Schellenberger *et al.,* 2011).

l'avantage d'utiliser un cocktail de Nb et la complémentarité de reconnaissance que ces Nb peuvent avoir, aussi bien pour élargir le spectre de détection que pour augmenter l'efficacité de détection du virus. Les essais de modélisation n'ont malheureusement pas permis d'ouvrir la voie à la recherche de Nb ciblant une région particulière de la capside, comme celle suspectée pour son implication dans la rétention du virus par le nématode vecteur *Xiphinema index*. Cependant, les analyses de données biologiques ont permis de montrer que les Nb 23 et p75, p59 et 122 sont situés au niveau de régions bordant cette cavité (décrite par le cercle en pointillés blanc figure 6.21) et connues pour être impliquée dans la transmission du virus par le nématode *X. index* (proche de la région R3 pour les Nb 23 et p75, au niveau de la région R2 pour le Nb p59 et de la région R5 pour le Nb 122). Ceci laisse à penser que les Nb 23, p59 et 122 pourraient tous être capables d'interférer avec la transmission du GFLV, si toutefois ils sont compatibles avec sa multiplication (ce qui n'est pas le cas du Nb 23, qui génère de la résistance au virus *in planta*).

Structural basis of Nanobody-mediated plant virus resistance and vector transmission revealed by cryo-EM

Caroline Hemmer[1,2], Igor Orlov[3*], Léa Ackerer[1,2,4*], Aurélie Marmonier[2], Kamal Hleibieh[1], Corinne Schmitt-Keichinger[1], Emmanuelle Vigne[2], Sophie Gersch[2], Véronique Komar[2], Lorène Belval[2], François Berthold[1], Baptiste Monsion[1], Patrick Bron[5], Olivier Lemaire[2], Bernard Lorber[6], Jean-Yves Sgro[7], Carlos Gutiérrez[8], Serge Muyldermans[9], Gérard Demangeat[2], Bruno P. Klaholz[3] and Christophe Ritzenthaler[1]

[*]These authors contributed equally to this work

Since their discovery[1], single-domain antigen-binding fragments of camelid-derived heavy chain-only antibodies, also known as Nanobodies (Nbs)[2], have proven to be of outstanding interest as therapeutics against human diseases and pathogens[3-5] including viruses[6-9], but their use against phytopathogens remains limited[10]. Many plant viruses including *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), a vector-transmitted icosahedral virus related to animal picornaviruses, have worldwide distribution and huge burden on crop yields representing billions of US dollars of losses annually, yet solutions to combat these viruses are often limited or inefficient[11,12]. Here we show that a Nb specific to GFLV confers strong resistance to GFLV upon stable expression in plants due to virus neutralization at an early step of the virus life cycle, prior to cell-to-cell movement. To address the involved molecular mechanisms, we determined the cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of the Nb-virus complex at 2.8 Å resolution revealing the stoichiometric 1:1 complex formed with the viral capsid protein (CP). Remarkably, the conformational surface epitope recognized by the Nb covers a cavity analogous to the canyon of picornaviruses implicated in receptor binding[13]. By showing that this cavity is also involved in nematode transmission of GFLV, our results suggest a structural conservation driving vector specificity and receptor binding among plant and animal *Picornavirales*. Our findings will not only be instrumental to confer resistance to GFLV in grapevine but more generally they pave the way for the generation of novel antiviral strategies in plants based on Nbs.

With well over 60 different viruses identified, grapevine (*Vitis* spp) is the crop with the highest number of infecting viruses[14], yet GFLV, the principal causal agent of grapevine fanleaf degeneration is probably the most detrimental and widespread grapevine virus. GFLV, as a member of the genus *Nepovirus* in the order *Picornavirales,* possess a positive-strand RNA genome. Its icosahedral capsid is formed by 60 copies of the CP, which folds into three jelly-roll ß sandwiches[15]. Initially, 23 Nbs belonging to 11 different families were isolated from an immune library generated against purified GFLV. Nb23 from this collection, which belongs to the family with the highest number of representatives

(Extended Data Fig. 1), was purified (Fig. 1a) and found by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) to recognize eight GFLV isolates (Fig. 1b) differing in CP composition (Extended Data Fig. 2). Despite extensive structural similarities, Nb23 failed to recognize *Arabis mosaic virus* (ArMV; Fig. 1b), a close relative of GFLV[16] (Extended Data Fig. 2). Dynamic light scattering analyses indicated that GFLV was monodisperse with a particle diameter of 32 nm ± 2 nm (mean ± SD) that increased to 36 ± 2 nm and 44 ± 2 nm upon binding of Nb23 or Nb23:EGFP at saturation, respectively (Fig. 1C), indicating that Nb23 binds to GFLV particles *in vitro*, and tags as large as GFP do not interfere with binding capacity. Further functional studies were performed in transgenic *Nicotiana benthamiana* constitutively expressing Nb23:EGFP or EGFP. Initially, segregating T1 plants were challenged with GFLV strain GHu, which causes a symptomatic infection[17] (Extended Data Fig. 3). EGFP-expressing plant lines inoculated with GFLV displayed symptoms and tested GFLV-positive in ELISA. In contrast, infection rates amongst the 25 different Nb23:EGFP expressing lines were generally reduced or even null (Extended Data Fig. 3), suggesting that Nb23:EGFP expression conferred resistance to GFLV. Nb23:EGFP-expressing T1 lines 23EG16 and 23EG38, which displayed intermediate levels of resistance, as well as the susceptible control line EG11 expressing EGFP (Extended Data Fig. 3), were selected for the production of homozygous T2 lines in which transgene expression was analyzed by confocal microscopy (Extended Data Fig. 4a), fluorimetry (Extended Data Fig. 4b), immunoblotting (Extended Data Fig. 4c) and RT-qPCR (Extended Data Fig. 4d). In leaves, both EGFP and Nb23:EGFP displayed a nuclear and cytoplasmic localization (Extended Data Fig. 4a) and average fluorescence in EG11-3 plants was 14.9 and 22.4 times higher than in 23EG16-9 and 23EG38-4 plants, respectively (Extended Data Fig. 4b). Fluorescent protein accumulation was estimated to represent 1.73, 0.12 and 0.07% of total soluble proteins in lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4, respectively (Extended Data Fig. 4b). Immunoblotting with anti-GFP antibodies confirmed differences in Nb23:EGFP vs EGFP steady-state levels and revealed full-length proteins were expressed to equivalent levels within plants from a given line (Extended Data Fig. 4c). In contrast, only a 1.5 to 2.0 fold difference in mean relative

accumulation of EGFP vs Nb23:EGFP transcripts was measured by RT-qPCR (Extended Data Fig. 4d), suggesting that translational or post-translational differences account for reduced steady-state protein levels in Nb23:EGFP- vs EGFP-expressing plants. It is likely that the plant cytoplasm is less favorable for Nb stability than the naturally oxidizing environment found upon immunoglobulin secretion in mammals[18,19].

To evaluate the behavior of homozygous T2 lines to infection, plants were challenged with various GFLV and ArMV isolates, either by mechanical inoculation or upon transmission of GFLV by its specific natural vector, the ectoparasitic dagger nematode *Xiphinema index*[20] (Table 1). When challenged with 300 ng of GFLV-GHu, EG11-3 plants were fully susceptible and showed typical symptoms (Extended Data Fig. 5a), whereas only one plant out of 19 in line 23EG38-4 and none out of 20 in line 23EG16-9 was infected at 21 days post-inoculation (dpi) (Table 1, Extended Data Fig. 5b). RT-qPCR analysis confirmed the single infection event in line 23EG38-4 and further revealed that infection was not due to partial or complete loss of Nb23:EGFP expression since relative accumulation of RNA encoding Nb23:EGFP was similar in all plants (Extended Data Fig. 5d). In accordance with the inability of Nb23 to recognize ArMV (Extended Data Fig. 2), all plant lines were fully susceptible to ArMV-S (Table 1, Extended Data Fig. 5c). In addition, whether challenged with eight different GFLV isolates (Extended Data Fig. 6), GFLV viral RNA (Extended Data Fig. 7) or with viruliferous nematodes (Extended Data Fig. 8), control line EG11-3 showed full susceptibility, contrarily to line 23EG16-9, which was fully resistant and line 23EG38-4 in which infection was observed at low frequency (2.5%, 157 plants, Table 1). In total, all of the 158 plants from line 23EG16-9 challenged with GFLV under various inoculation conditions remained virus-free (Table 1), showing that constitutive expression of Nb23:EGFP confers broad range resistance to GFLV in transgenic *N. benthamiana* including upon natural vector transmission. They also suggest that virus neutralization occurs early during infection, which was assessed by monitoring infection using a recombinant GFLV encoding TagRFP[21]. Whereas numerous infection foci (64.3 +/- 5.9 foci) were

91 counted on inoculated leaves from three independent EG11-3 plants (Fig. 1d and f), no evidence of
92 infection in equivalent leaves from 23EG16-9 plants was detected (Fig. 1e and f). Altogether, our results
93 show that Nb23 displays potent antiviral activity against GFLV *in planta* and virus neutralization occurs
94 early during infection before cell-to-cell movement.
95
96 To gain molecular insights into the virus-Nb interface mediating resistance, the structure of the GFLV-
97 Nb23 complex was determined by high-resolution single particle cryo-EM (Fig. 2). Using high-sensitivity
98 detector technologies and angular reconstitution method[22,23], the structure (Figs. 2a and b) was refined to
99 an average resolution of 2.8 Å, as estimated from Fourier shell correlation[24,25] (Extended Data Fig. 9; see
100 Methods). Local resolution estimation shows that, while Nb23 is moderately ordered at the periphery
101 (3.5-5 Å resolution towards the C-terminus), it is very well defined in the region oriented towards the
102 capsid (including the antigen-binding loops) where the side-chains are visible, like for the virus capsid
103 (Fig. 2c). The cryo-EM map was used to build and refine an atomic model with proper model geometry
104 and statistics involving iterative manual model building (notably of the antigen-binding loops) and
105 structure refinement (see methods). The structure reveals that Nb23 binds at the surface of GFLV in the
106 vicinity of the 5-fold axis (Figs. 2a and b). The outer isocontour surface of the GFLV-Nb23
107 reconstruction (Figs. 2a and b and Extended Data Fig. 9) shows that the Nb23 molecules are positioned
108 far enough from each other to allow 60 of them to attach and reach full 1:1 stoichiometric binding without
109 bridging neighboring CPs. The interaction region essentially involves residues of the complementarity
110 determining regions (CDR) 3 and CDR2 of Nb23, as well as the two neighboring CP domains A and B (2
111 out of the 3 jellyroll ß-sandwiches of the CP) that jointly form a composite binding site with two core
112 interacting regions denoted 1 and 2 (Fig. 2d), adding up to a large total interaction surface of ~1100 $Å^2$
113 indicative of a stable complex. Within these regions, a high level of specific interactions between the
114 capsid and the antibody is provided through a series of hydrogen bonds. Region 1 (Fig. 2e) comprises
115 loop region 212-216 (ßC'') of domain B of the CP in which Thr212 interacts with $Asp100_{Nb23}$, Lys214

forms hydrogen bonds with the carbonyl backbone of Ile102$_{Nb23}$, and Tyr216 interacts with the backbone of Leu104$_{Nb23}$ and forms hydrophobic contacts with Leu104$_{Nb23}$. Region 2 (Fig. 2f) comprises the two strands of the capsid ß-sheet region 370-391 (domain A of the CP) in which Asp371 forms a salt bridge with Arg55$_{Nb23}$ and Asn375 interacts with Thr58$_{Nb23}$. An additional anchor point of the antibody is provided through Lys65$_{Nb23}$ (Fig. 2f). In the second ß-strand of the 370-391 region, the backbone of Val379 interacts with Thr110$_{Nb23}$, and the Ser380 backbone and Met381 form hydrophobic contacts with Ser109$_{Nb23}$ and Trp108$_{Nb23}$, respectively. The CDR3 forms a long loop with a short α-helical turn carrying Leu104$_{Nb23}$ which is accommodated within a hydrophobic pocket formed by Phe502, Val504, Tyr216, Phe370 and an alanine cluster formed by residues 387, 388 and 391 (Fig. 2e). Phe370 provides π-stacking interactions with the side-chain of Trp108$_{Nb23}$, which deeply inserts into the binding site within a cavity formed at the junction of the A and B domains of the CP. Finally, the C-terminal Phe502 and Val504 residues form hydrophobic contacts with Tyr107$_{Nb23}$, Trp108$_{Nb23}$ and Leu104$_{Nb23}$. Taken together, the cryo-EM structure provides a precise mapping of the Nb23 epitope on the GFLV capsid and identifies the key residues of GFLV and Nb23 (residues 55-65 of CDR2 and 100-110 of CDR3) involved in the specific molecular recognition events occurring upon complex formation.

Our results reveal a partial overlap between the Nb23 projected surface and the predicted ligand-binding pocket[15] (LBP, Fig. 3a), in particular the loops surrounding the C′C″ loops in the B-domain for which a function in nematode transmission has been anticipated[15,26]. The structure suggests that Nb23 competes with virus-receptor binding and consequently interferes with GFLV transmission by nematodes. Due to intrinsic neutralizing activity of Nb23 against GFLV *in planta*, this hypothesis cannot be tested. However, mutations in the CP preventing Nb23 antiviral activity as anticipated from escape variants, should interfere with Nb23 binding and possibly also with virus transmission. Emergence of escape mutants was observed at high inoculum pressure (3 µg versus 300 ng), condition under which resistance was overcome in 30% and 40% of plants from lines 23EG38-4 and 23EG16-9, respectively (Extended Data Fig. 10). Sequencing of GFLV escape variants revealed mutations (Extended Data Fig. 11) that all map to residues

exposed at the outer-surface of the capsid and are directly involved in Nb23-virus interactions (Figs. 2e and 2f), remarkably consistent with the Nb23 conformational surface epitope (Fig. 3a). Beside the $Tyr_{216}His$ and $Phe_{502}Leu$ point mutants, all other identified mutations (8 out of 10) resulted in C-terminal extensions of the CP by 3 (CP+3), 6 or 12 residues (Fig. 3a, Extended Data Fig. 11). The C-terminal residue Val504 being next to $Tyr107_{Nb23}$ and $Lys54_{Nb23}$ (Fig. 2f), it is clear that such extensions would prevent Nb23 from binding to GFLV due to steric clashes. To confirm this hypothesis, the CP+3 mutation was introduced in a GFLV-GHu infectious clone[17]. As expected, plants challenged with cloned wild-type GFLV-GHu remained resistant. In contrast, the CP+3 mutant formed virus particles (Fig. 3b) and fully infected 23EG16-9 plants (100% infection) indicating that the mutation was necessary and sufficient to overcome Nb23-mediated resistance and did not alter the capacity of the CP to assemble into virion (Table 1). In addition, GFLV-CP+3 and GFLV-$Tyr_{216}His$ mutants were recognized by conventional anti-GFLV antibodies but poorly by Nb23 in DAS-ELISA (Extended Data Fig. 12). Altogether, our structural and functional data clearly establish that mutations in GFLV escape variants directly map to the Nb23 epitope, affect Nb23 binding capacity, and locate to the vicinity of the LBP. Whether these mutations impair transmission, as hypothesized above, was further assessed with GFLV-$Tyr_{216}His$, $Phe_{502}Leu$ and CP+3 mutants. While both single point mutants were vectored, transmission of GFLV-CP+3 was completely abolished (Fig. 3c), uncovering a new important function of residues in the vicinity of the C-terminal Val504 in GFLV transmission by *X. index*.

Because each Nb binds to a single CP without bridging neighboring CPs, the mechanism of virus neutralization may consist in early CP tethering prior to capsid assembly or stabilization of the particles once assembled, as suggested for animal viruses[27]. Since GFLV moves from cell-to-cell as entire virions in a tubule-guided manner[21], Nb23 may also prevent virus movement. Another important finding of our study is the link between virus neutralization and nematode transmission. Remarkably, the Nb-binding site overlaps in part with a cavity analogous to the canyon of picornaviruses to which host cell membrane

166 receptors bind[13], suggesting a structural conservation across *Picornavirales* driving vector specificity and
167 receptor binding. Last but not least, our findings demonstrate the strong potential of Nbs for the
168 generation of novel antiviral strategies in plants.

References

1 Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally-occurring antibodies devoid of light-chains. *Nature* **363**, 446 - 448 (1993).

2 Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775-797, doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449 (2013).

3 Kijanka, M., Dorresteijn, B., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine* **10**, 161-174 (2015).

4 Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A. & Cambillau, C. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current opinion in structural biology* **32**, 1-8 (2015).

5 Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* **8**, 1013-1026 (2013).

6 Rouvinski, A. *et al.* Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature* **520**, 109-113, doi:10.1038/nature14130 (2015).

7 Lülf, S. *et al.* Structural basis for the inhibition of HIV-1 Nef by a high-affinity binding single-domain antibody. *Retrovirology* **11**, 1-13 (2014).

8 Tarr, A. W. *et al.* An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* **58**, 932-939 (2013).

9 Vanlandschoot, P. *et al.* Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral res.* **92**, 389-407 (2011).

10 Ghannam, A., Kumari, S., Muyldermans, S. & Abbady, A. Q. Camelid nanobodies with high affinity for broad bean mottle virus: a possible promising tool to immunomodulate plant resistance against viruses. *Plant Mol. Biol.* **87**, 355-369 (2015).

11 Maliogka, V. I., Martelli, G. P., Fuchs, M. & Katis, N. I. Control of viruses infecting grapevine. *Adv. Virus Res.* **91**, 175-227, doi:10.1016/bs.aivir.2014.11.002 (2015).

12 Scholthof, K.-B. G. *et al.* Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **12**, 938-954, doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x (2011).

13 Rossmann, M. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* **264**, 14587-14590 (1989).

14 Martelli, G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* **96**, 1-136, doi:doi: 10.4454/JPP.V96I1SUP (2014).

15 Schellenberger, P. *et al.* Structural insights into viral determinants of nematode mediated Grapevine fanleaf virus transmission. *PLoS Pathog.* **7**, e1002034, doi:10.1371/journal.ppat.1002034 (2011).

16 Lai-Kee-Him, J. *et al.* The backbone model of the Arabis mosaic virus reveals new insights into functional domains of Nepovirus capsid. *Journal of structural biology* **182**, 1-9, doi:10.1016/j.jsb.2013.01.007 (2013).

17 Vigne, E. *et al.* A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in Nicotiana species. *J. Gen. Virol.* **94**, 2803-2813 (2013).

18 Lentz, E. M. *et al.* Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. *Planta* **236**, 703-714 (2012).

19 Saerens, D., Conrath, K., Govaert, J. & Muyldermans, S. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *Journal of molecular biology* **377**, 478-488 (2008).

20 Andret-Link, P. & Fuchs, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. *J. Plant Pathol.*, 153-165 (2005).

21 Amari, K. *et al.* A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6**, e1001119, doi:10.1371/journal.ppat.1001119 (2010).

22 Van Heel, M. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* **21**, 111-123 (1987).

23 van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R. & Schatz, M. A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.* **116**, 17-24, doi:10.1006/jsbi.1996.0004 (1996).

24 Rosenthal, P. B. & Henderson, R. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **333**, 721-745 (2003).

25 van Heel, M. & Schatz, M. Fourier shell correlation threshold criteria. *J. Struct. Biol.* **151**, 250-262, doi:10.1016/j.jsb.2005.05.009 (2005).

26 Schellenberger, P. *et al.* A stretch of 11 amino acids in the betaB-betaC loop of the coat protein of grapevine fanleaf virus is essential for transmission by the nematode Xiphinema index. *J. Virol.* **84**, 7924-7933, doi:10.1128/JVI.00757-10 (2010).

27 Schotte, L. *et al.* Mechanism of action and capsid-stabilizing properties of VHHs with an in vitro antipolioviral activity. *J. Virol.* **88**, 4403-4413 (2014).

28 Xiao, C. & Rossmann, M. G. Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections. *J. Struct. Biol.* **158**, 182-187 (2007).

Acknowledgments

We thank Félix Rey, Marc Fuchs and Robert Drillien for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) award ANR-COMBiNiNG ANR-14-CE19-0022, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université de Strasbourg, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Bacchus Interreg IV project and the Conseils Interprofessionels des vins d'Alsace, Champagne, Bourgogne et Bordeaux. C.H. was supported by a fellowship from the Région Alsace and the "Plant Health and the Environment" INRA division. L.A. is supported by a CIFRE grant from the Institut Français de la Vigne et du Vin, subsidized by the ANRT (CIFRE convention number 2012/0929). The electron microscope facility at the CBI was supported by the Région Alsace, the FRM, the IBiSA platform program, INSERM, CNRS and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01, and Instruct as part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI).

Author information

These authors contributed equally to this work

Igor Orlov & Léa Ackerer.

Affiliations

[1]Institut de biologie moléculaire des plantes du CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg cedex, France.

[2]Institut national de la recherche agronomique, Université de Strasbourg, UMR 1131, 28 rue de Herrlisheim, BP 20507, 68021 Colmar cedex, France.

[3]Centre de biologie intégrative, Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, CNRS UMR 7104-Inserm U964, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch cedex, France.

[4]Institut français de la vigne et du vin, Domaine de l'Espiguette. 30240 Le Grau du Roi, France.

[5]Centre de biochimie structurale, CNRS UMR 5048, Inserm UMR 1054, Université de Montpellier, Montpellier, 34090, France.

[6]Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France.

[7]Institute for molecular virology, University of Wisconsin-Madison, 1525 Linden drive, Madison WI 53706, USA.

[8]Research Institute of Biomedical and Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35416, Arucas, Las Palmas, Spain.

[9]Cellular and molecular immunology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium.

*Corresponding authors. E-mail: ritzenth@unistra.fr (C.R.), klaholz@igbmc.fr (B.P.K.) and gerard.demangeat@colmar.inra.fr (G.D.)

Contributions

C.H., I.O., L.A., A.M., K.H., C.S.-K., E. V., B.L., C.G., S.M., G.D., B.P.K. and C.R. conceived and designed the experiments; C.H., I.O., L.A., A.M., K.H., C.S.-K., E. V., S.G., V.K., L.B., F.B., B.M., B.L., J.-Y.S., C.G., G.D. and B.P.K. performed the experiments; all authors analyzed the data; C.H, B.P.K. and C.R. wrote the paper, with contributions from all authors; C.R. coordinated the project.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Corresponding authors

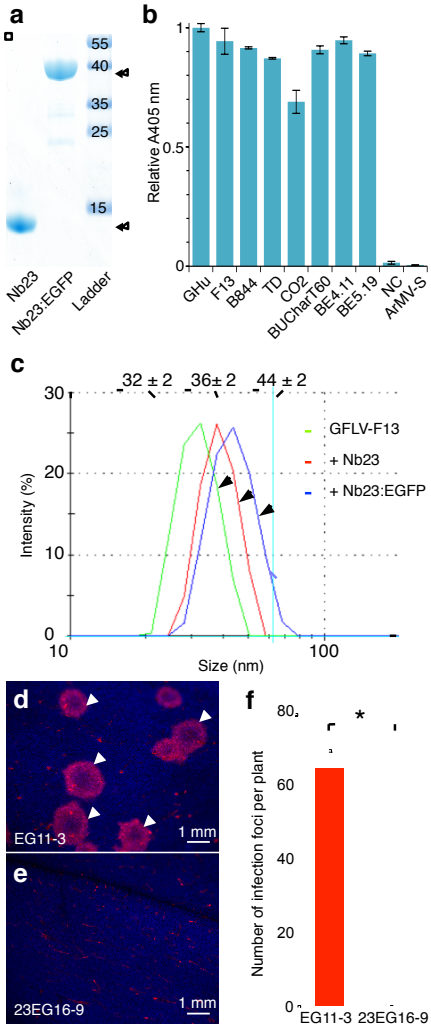
Correspondence to: Christophe Ritzenthaler or Bruno P. Klaholz or Gérard Demangeat

Accession code

Cryo-EM map and coordinates of the atomic model have been deposited under accession codes EMDxxx and yyy.pdb.

Isolate	Inoculation	EG11-3			23EG16-9			23EG38-4			Extended Data Figure #
		Number of plants tested	Number of plants infected	Infection rate	Number of plants tested	Number of plants infected	Infection rate	Number of plants tested	Number of plants infected	Infection rate	
GFLV-GHu	300 ng	19	19	100 %	20	0	0 %	19	1	5.3 %	S5
	sap	24	24	100 %	24	0	0 %	24	0	0 %	S6
	RNA 360 ng	10	10	100 %	10	0	0 %	10	1	10 %	S7
GFLV-F13	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	0	0 %	S6
	nematodes	13	12	92 %	20	0	0 %	20	0	0 %	S8
GFLV-B844	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	0	0 %	S6
GFLV-TD	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	1	8 %	S6
GFLV-CO2	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	1	8 %	S6
GFLV-BUCharT60	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	0	0 %	S6
GFLV-BE 4.11	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	1	8 %	S6
GFLV-BE 5.19	sap	12	12	100 %	12	0	0 %	12	0	0 %	S6
Total GFLV		**150**	**149**	**99.3 %**	**158**	**0**	**0.0 %**	**157**	**5**	**3.2 %**	
ArMV-S	300 ng	10	10	100 %	10	10	100 %	10	10	100 %	S5
GFLV-G1G2	sap	10	10	100 %	10	0	0 %	nd	nd	nd	
GFLV-CP+3	sap	10	10	100 %	10	10	100 %	nd	nd	nd	

Table 1 | Nb23:EGFP confers broad range resistance to GFLV but not to ArMV in transgenic *N. benthamiana.* T2 transgenic lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4 were mechanically inoculated with 300 ng of purified virus, crude sap of infected plants or 360 ng viral RNA and upper systemic leaves were tested for GFLV or ArMV by DAS-ELISA at 21 days post-inoculation, except for nematode inoculation for which roots were left in contact with viruliferous nematodes for 6 weeks and DAS-ELISA performed on leaves 16 weeks post-contact. nd, not determined.



294

295 **Fig. 1 | Nb23 recognizes GFLV and virus neutralization occurs at the cellular level. a**, Coomassie-
296 blue stained denaturing gel with purified Nb23 and Nb23:EGFP (arrowheads). **b**, Nb23-based DAS-
297 ELISA results of *Chenopodium quinoa* infected with eight different GFLV isolates and ArMV-S. NC,
298 healthy plant. Bars correspond to values from experimental duplicates. **c**, Dynamic light scattering (DLS)
299 analyses of GFLV-F13 alone (green curve) and GFLV complexed to Nb23 (red curve) or to Nb23:EGFP
300 (blue curve). Mean hydrodynamic diameters in nm and standard deviations are indicated above each
301 particle size distribution. Fluorescence images from EGFP- **d**, and Nb23:EGFP- **e**, expressing
302 *N. benthamiana* leaves inoculated with a recombinant GFLV encoding TagRFP, at 6 dpi. Arrowheads
303 point at typical GFLV infection foci. Blue channel corresponds to chlorophyll and faint red background in

304 **d**, and **e**, to autofluorescence generated by physical damage upon mechanical inoculation. **f**, Average
305 number of infection foci calculated from three different leaves and three independent plants from lines
306 EG11-3 and 23EG16-9. Bars and error bars correspond to mean and standard deviation, respectively. The
307 asterisk indicates statistically significant differences (two tailed paired *t*-test, $P = 0.006$).

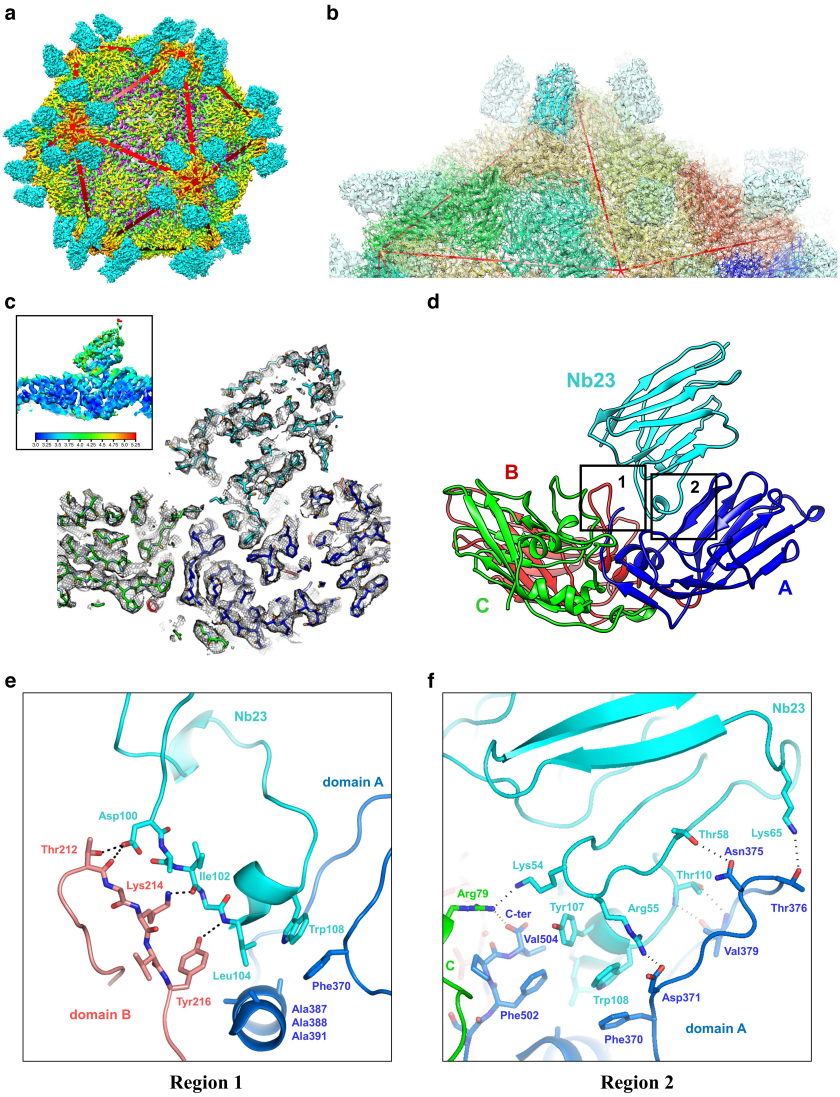


Fig. 2 | The 2.8 Å resolution cryo-EM structure of the GFLV-Nb23 complex. **a**, Global 3D reconstruction of the GFLV-Nb23 complex with Nb23 shown in cyan on the GFLV outer surface. Icosahedral edges are indicated by red triangles. **b**, Detailed view of the cryo-EM map with the fitted atomic model showing the three CP and three Nb23 per icosahedron face. **c**, Local resolution map through a cross section of the structure. Average resolution ranges from ≥ 5.25 Å (red) to ≤ 3.0 Å (blue) according to the heat map color code. A thin slice of the cryo-EM map reveals the intimate contact between Nb23 residues (cyan) and GFLV surface (blue, green, red). **d**, Ribbon diagram of the Nb23-GFLV contact site with close up views of the boxed regions 1 and 2 with detailed molecular interactions shown in panels **e** and **f**, respectively (hydrogen bonds are indicated by dotted lines).

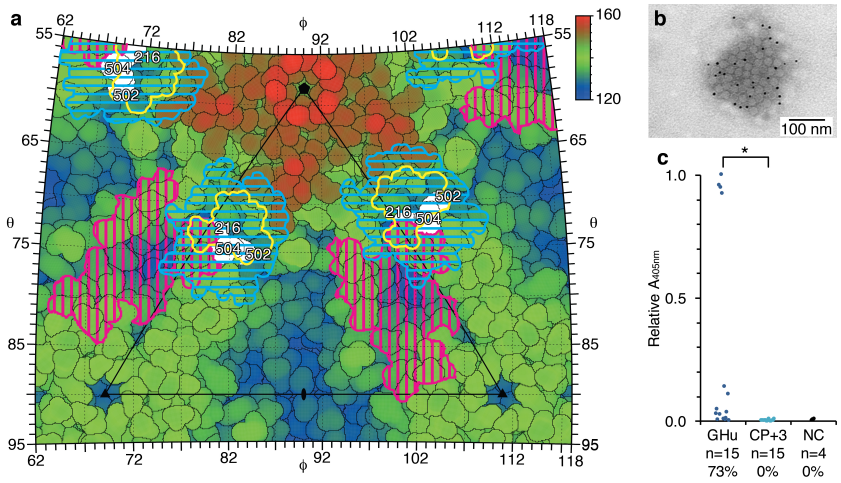


Fig. 3 | Overcoming Nb23-mediated resistance can occur at the expense of transmission. a, Roadmap[28] showing the projected surfaces of the GFLV for one (triangular) icosahedral asymmetric unit in which the polar angles θ and ϕ represent latitude and longitude, respectively. The coloring is according to the radial distance of the surface from the center of the particle. The Nb23 footprints and projected surfaces are delineated in yellow and cyan, respectively, the ligand binding pockets (LBPs) in magenta and mutated residues in GFLV escape variants shown in white together with amino acid positions. The mosaic background shows the amino acids that form the viral surface. **b**, Immunogold labeled GFLV-CP+3 particles. **c**, Transmission efficiency of GFLV-GHu and GFLV-CP+3 by nematodes. Dots correspond to DAS-ELISA results from individual bait plants and represent the mean relative A_{405nm} of experimental replicates normalized against maximum assay value. The asterisk indicates statistically significant differences (two tailed paired *t*-test, $P = 0.022$). Number of plants tested (n) and percentage of infections (%) are provided below each column. NC, healthy plants.

Discussion et Perspectives

Discussion et perspectives

Depuis l'article fondateur (Hamers-Casterman *et al.,* 1993) décrivant la découverte des anticorps à chaînes lourdes chez les camélidés, puis la mise en évidence des propriétés biophysiques et structurales exceptionnelles des VHH (Muyldermans, 2001), encore dénommés Nanobody®, l'intérêt suscité par ces molécules n'a cessé de croitre. En un peu plus de vingt ans, l'intérêt suscité par les Nanobodies (Nb) s'est étendu à de nombreux domaines allant de la recherche fondamentale à la thérapie médicale, en passant par le diagnostic, l'imagerie ou encore la biologie structurale. Paradoxalement, leurs applications dans le domaine végétal et plus encore dans le domaine du phytodiagnostic restent encore très restreintes.

L'objectif principal de ma thèse consistait à développer un test de diagnostic du GFLV et de l'ArMV de type DAS-ELISA, basé exclusivement sur l'utilisation de Nb, tant comme réactif de coating pour la capture des particules virales, que comme réactif de détection pour révéler leur présence dans un échantillon infecté.

L'obtention de 23 Nb anti-GFLV appartenant à 11 familles et de 47 Nb anti-ArMV appartenant à 25 familles a permis d'explorer le potentiel de diagnostic des Nb contre ces deux pathogènes majeurs de la vigne. Le criblage des collections de vignes infectées a d'abord permis de vérifier la capacité de détection des Nb soit grâce aux Nb-6HisST par DAS-ELISA (pour les Nb anti-GFLV), soit par PE-ELISA (pour les Nb anti-ArMV). Ces analyses préliminaires ont conduit à la sélection de Nb présentant un large spectre qui, en combinaison, permettent de détecter tous les isolats testés jusqu'à présent. Les résultats de criblage de vignes infectées provenant des collections de l'INRA de Colmar et de l'IFV ont révélés des différences de reconnaissance entre Nb d'une même famille. C'est notamment le cas des Nb anti-GFLV de la famille majoritaire, qui ne reconnaissent pas tous les mêmes isolats (par exemple, les Nb p71, 101 et 126 qui ne reconnaissent pas cinq isolats de la collection de l'INRA de Colmar, reconnus par les Nb 23 et p75). Ceci peut s'expliquer par une différence d'affinité de ces Nb envers lesdits isolats, car il est communément admis que les Nb d'une même famille reconnaissent généralement le même épitope mais avec une affinité différente (Muyldermans, 2001).

À partir de la sélection des Nb les plus performants, le développement de Chromobodies (Cb), issus de la fusion d'un Nb à une protéine fluorescente, comme réactif de coating a été

rendu possible grâce à leur production en bactéries SHuffle. L'utilisation de Cb en coating n'ayant jamais été décrite dans la littérature, l'évaluation de leurs capacités de capture et d'adsorption était nécessaire et a clairement confirmé leur efficacité. Il convient cependant de noter que d'une manière générale la purification à homogénéité des Cb n'a pas été possible. En conséquence, il est difficile de savoir si les contaminants présents dans les réactifs de coating peuvent impacter de manière négative l'efficacité d'adsorption des Cb, la capture des particules virales, ou encore augmenter le bruit de fond du DAS-ELISA. Les conditions d'extraction et de purification pourraient être améliorées, notamment en modulant la composition du tampon, les concentrations salines et le pH, qui constituent des paramètres très importants contribuant à l'obtention de protéines purifiées à homogénéité (Huynh et Partch, 2015). L'efficacité de coating des Cb et des Nb-GST s'étant révélée équivalente, il serait également intéressant de comparer les profils de purification de ces deux Nb-P d'origine cytoplasmique à ceux résultants d'une production périplasmique à l'aide d'une GST mutée périplasmique fonctionnelle (Tudyka et Skerra, 1997). À l'instar des réactifs de détections Nb-PAL produits dans le périplasme et pour lesquels de bons rendements de production et de purification ont été obtenus, la production de Nb-GST périplasmiques pourrait potentiellement améliorer la pureté des réactifs de coating et donc leur efficacité. Même si les Cb donnent entière satisfaction en tant que réactif de coating, il aurait été également intéressant de comparer leur efficacité face à une protéine de fusion de type Nb-Fc de nature divalente, qui présente une adsorption passive sur la plaque ELISA comparable à celle d'anticorps conventionnels et déjà décrite comme réactif de coating (Stijlemans *et al.,* 2011).

Après avoir développé les réactifs de coating, j'ai montré que les Nb fusionnés à la PAL pour la détection du GFLV ou de l'ArMV sont fonctionnels en DAS-ELISA et sont un atout majeur du test Nb. L'obtention d'une telle protéine de fusion permet notamment de réduire significativement les coûts et le temps de production du réactif de détection. En effet, pour les tests commerciaux, la production du réactif de détection est basée sur la purification d'anticorps poly- ou monoclonaux, leur couplage à la phosphatase alcaline et la purification des anticorps ainsi couplés. Ceci représente un coût important, pouvant correspondre non seulement à l'achat des anticorps poly- ou monoclonaux, mais surtout à l'achat de la phosphatase alcaline et des réactifs de couplage, ainsi qu'au temps de main d'œuvre d'un personnel qualifié. Enfin, une quantité non négligeable d'anticorps est perdue durant les

phases de couplage et de purifications, diminuant le rendement de production de réactifs conjugués à l'enzyme. La purification des Nb-PAL produits à partir d'*E. coli* telle que décrite dans mon manuscrit ne nécessite quant à elle qu'une simple chromatographie d'affinité de type IMAC suivie d'une dialyse et évite l'achat de réactifs spécifiques onéreux.

L'évaluation du spectre de la collection des 23 Nb anti-GFLV puis le criblage de la banque de Nb anti-GFLV contre de l'ArMV-S n'ont pas permis d'identifier de Nb capable de détecter le GFLV et l'ArMV de façon indifférenciée. Cependant, le Nb 3082 est le seul Nb ayant présenté une réaction croisée contre ces deux virus, mais seulement lors d'une production cytoplasmique de ce Nb en bactéries SHuflle, pour des raisons qui ne sont pas comprises pour l'instant. Ce Nb fait partie de la famille 19 qui contient 10 autres membres qui n'ont pas été caractérisés. Le clonage et la production de ces 10 autres Nb seraient intéressants pour évaluer leur capacité à reconnaître l'ArMV et le GFLV, dans le but de développer des réactifs de détection de ces deux virus simultanément. Il serait aussi intéressant de cribler à nouveau la banque de Nb anti-ArMV avec du GFLV-F13 pour, peut être, conduire à l'isolement de Nb permettant la détection simultanée des deux virus, comme cela a déjà été montré pour un anticorps monoclonal anti-ArMV (Frison et Stace-Smith, 1992) ou anti-GFLV (Nolke *et al.,* 2009). Un tel Nb serait potentiellement intéressant pour le développement d'un test dit « court-noué associé » dirigé contre les deux principaux virus responsables de la maladie du court-noué en Europe. Néanmoins, à ce stade, mes résultats montrent qu'un tel test est possible, mais sur la base d'un mélange de Nb qu'il conviendrait de définir et d'optimiser.

Aux vues de l'ensemble de mes résultats, les tests complets Nb aussi bien anti-GFLV qu'anti-ArMV semblent supérieurs aux tests commerciaux, tant pour les critères de spécificité que de sensibilité. Ces résultats sont la preuve de concept qu'un DAS-ELISA composé uniquement de Nb pourrait à l'avenir remplacer les kits commerciaux composés d'anticorps conventionnels et ce, à moindre coût. Mes résultats ont attiré l'attention de l'entreprise Bioreba AG (Reinach, Suisse) pour une commercialisation éventuelle, et l'obtention de nouveaux Nb s'étend maintenant à d'autres virus infectant la vigne dans le cadre de l'ANR Vinobodies. En effet, sur la base de mes résultats concernant le diagnostic et de ceux obtenus en matière de lutte antivirale (voir Hemmer *et al.,* 2016, chapitre 6), le développement de la technologie Nanobodies est poursuivi pour lutter contre d'autres virus responsables de la maladie du court-noué (RpRSV, SLRSV, TBRV) ainsi que contre d'autres

maladies virales de la vigne, telles que la maladie de l'enroulement et ses ampélovirus majeurs (GLRaV-1 et GLRaV-3) ainsi que la maladie du bois strié, notamment contre ses vitivirus majeurs (GVA et GVB). Ce projet est une nouvelle fois basé sur la collaboration entre l'IBMP et l'INRA de Colmar, associés à l'équipe de Serge Mulydermans, et fait l'objet des contrats post-doctoraux de Vianney Poignavent (IBMP) et d'Antoine Alliaume (INRA). La caractérisation de Nb contre ces virus de la vigne est actuellement en cours, et a déjà conduit à l'obtention de nombreux Nb différents contre le RpRSV et le SLRSV.

La caractérisation rapide de ces Nb pourrait être réalisée par PE-DAS-ELISA, ce test présentant l'avantage de favoriser la sélection de Nb au spectre potentiellement large mais aussi les Nb se produisant facilement en bactéries. Cependant, aux vues des résultats obtenus pour les Nb anti-ArMV et notamment avec le Nb 1047, certains Nb pourraient être écartés lors de ce type de test alors qu'ils pourraient être intéressants comme réactif de diagnostic. En effet, le Nb 1047 aurait été écarté si le seuil de positivité du PE-DAS-ELISA contre les différents isolats d'ArMV n'avait pas été intentionnellement abaissé, alors que ce Nb s'avère être *in fine*, l'un des deux Nb utilisés comme réactif dans le test Nb anti-ArMV. C'est pour cela qu'une nouvelle stratégie, permettant le criblage rapide des Nb obtenus est en cours de développement, grâce à une technique de clonage appelée GoldenGate (Engler, Kandzai et Marillonnet, 2008). Cette technologie est basée sur l'activité d'endonucléases de type IIS qui coupent l'ADN à des positions particulières, proches ou au sein de leurs séquences de reconnaissance, ainsi que sur celle de la T4 DNA ligase. Appliquée à notre problématique, cette technique permettrait de cloner en une réaction unique différents fragments, tels que ceux codants pour les Nb et pour la PAL dans un même vecteur d'expression, afin de procéder au criblage rapide de différents isolats viraux en DAS-ELISA directement avec des réactifs prêts à entrer dans la composition d'un test Nb.

En plus des virus cités précédemment correspondant aux viroses majeures de la viticulture, il serait évidemment intéressant d'étendre le portfolio des Nb contre d'autres virus de vigne émergents, notamment le *Red blotch virus (*Sudarshana, Perry et Fuchs, 2015*)* mais aussi le *Grapevine pinot gris virus* (Giampertruzzi *et al.,* 2012*)*, dont les moyens de diagnostic actuels sont limités.

En parallèle du projet principal visant à élaborer un test de diagnostic Nb, j'ai pu mener des analyses permettant la caractérisation d'épitopes reconnus par les Nb. L'idée initiale ayant conduit à la production de Nb anti-GFLV était de développer un outil permettant de suivre le virus lors des étapes précoces de l'infection virale et de la transmission du virus par les nématodes, mais aussi de comprendre le mécanisme moléculaire de la transmission. Pour ce dernier objectif, le but était de trouver un Nb ciblant la cavité présente à la surface du GFLV, dénommé *Nematode Binding Pocket* (NBP), décrite comme étant potentiellement impliquée dans la transmission par *X. index* (Schellenberger *et al.,* 2011). L'obtention de 23 Nb appartenant à 11 familles différentes laissait présager la détection de 11 épitopes potentiellement différents, parmi lesquels pouvait se trouver un épitope chevauchant ou proximal de cette cavité. Ayant identifié les conditions permettant d'obtenir un complexe Nb/GFLV monodisperse et de taille attendue en optimisant le pH et la concentration en sel, la structure atomique du complexe Nb 23/GFLV-F13 par cryo-EM a été obtenue avec une résolution de 2.8 Å. L'analyse de la structure a permis d'identifier avec exactitude l'épitope du Nb 23 et de montrer que 60 Nb sont fixés à la surface du GFLV (Hemmer *et al.,* 2016 ; chapitre 6). Le fait que 60 Nb se fixent à la surface de la particule virale pourrait expliquer la le signal plus important en ELISA pour le test Nb par rapport au test commercial, les Nb offrant une couverture maximale de la particule virale et conférant donc un signal maximal en ELISA.

En combinant les données structurales, les données biologiques et les analyses de séquences des variants de GFLV non reconnus par les Nb, il a été possible de proposer des épitopes pour les Nb 155, 122 et p59. Les épitopes de ces deux derniers Nb correspondent ou se superposent à des régions de la surface de la CP identifiées comme des déterminants de la transmission du GFLV par *X. index* (région R2 pour le Nb p59 et région R5 pour le Nb 122), situées sur les bords de la NBP (Schellenberger *et al.,* 2010 ; 2011). Des plantes transgéniques *Nicotiana benthamiana* exprimant de manière constitutive les Cb 122-TR et p59-TR, développées au laboratoire par Kamal Hleibieh, ne confèrent pas de résistance au GFLV mais permettent le *tracking* du virus *in planta*. Il serait intéressant d'évaluer la transmission du GFLV par *X. index* à partir de ces deux lignées de plantes transgéniques, afin de déterminer si la fixation des Cb p59-TR ou 122-TR à la surface du GFLV peuvent empêcher sa transmission par les nématodes.

Il serait également intéressant de poursuivre ce travail et de rechercher d'autres Nb ciblant cette NBP parmi les Nb appartenant aux autres familles (familles 4, 5, 7, 9, 10, 11) dont les épitopes reconnus n'ont pas été identifiés. Certaines de ces familles n'ayant que peu ou pas été caractérisées (notamment les Nb des familles 5 et 10, dont la capacité de reconnaissance des isolats de GFLV n'a jamais été évaluée) il serait possible d'identifier un Nb capable de reconnaître la NBP suite à des expériences d'ELISA compétitif. En effet, un Nb capable d'entrer en compétition avec le Nb p59 et à la fois avec le Nb 122 pourrait être un bon candidat pouvant cibler la NBP. Le spectre de reconnaissance de ce Nb devrait alors être testé, afin de déterminer si cet épitope est effectivement conservé dans la population virale.

Concernant la lutte antivirale contre le GLFV médiée par les Nb, le mécanisme de résistance induit par le Nb 23 reste encore à élucider. Il semblerait que celui-ci ait lieu en amont du mouvement de cellule à cellule et pourrait s'expliquer par une stabilisation de la particule virale limitant la décapsidation, suite à la fixation du Nb 23. Des expériences de *thermal shift* réalisées par Kamal Hleibieh ont montré une augmentation de la stabilité de la capside virale de 9,5°C en présence du Nb 23, passant de 50.3°C pour le virus seul à 59.8°C pour le complexe ; et pourraient expliquer les propriétés neutralisantes du Nb 23 *in planta*. Cependant, la stabilisation des particules virales n'est pas toujours corrélée au pouvoir neutralisant des Nb, comme cela a été montré avec le poliovirus (Schotte *et al.,* 2015). Ainsi, le mécanisme de résistance semble complexe et pourrait impliquer l'inhibition de plusieurs étapes du cycle viral telles que la décapsidation, l'encapsidation, ou le mouvement de cellule à cellule. La résistance au GFLV médiée par les Nb est actuellement étudiée chez la vigne à l'Inra de Colmar où elle est développée sur des porte-greffes par Samia Djennane. Ceci pourrait mener à l'obtention de porte-greffes résistants à l'infection par le GFLV et serait un nouveau moyen de lutte contre la propagation de cette maladie au vignoble. La résistance au GFLV induite par les Nb a fait l'objet d'un dépôt de brevet pour lequel je fais partie des inventeurs (WO 2015110601 A1).

Au laboratoire, des travaux menés dans le cadre de la thèse de Lorène Belval ont récemment montré la capacité des particules de GFLV à s'auto-assembler en virus-like particles ou VLP, y compris lorsque la CP est fusionnée à une protéine de type XFP (EGFP ou TagRFP) en N ou C-terminal. La fusion N-terminale conduit à l'internalisation de la protéine fluorescente alors que la fusion à l'extrémité C-terminale aboutit à l'exposition de cette dernière en surface de

la particule (Belval *et al.,* 2016). Cette capacité originale du GFLV est intéressante pour diverses applications biotechnologiques. Mes travaux sur l'identification d'épitopes reconnus montrent que les Nb pourraient être exploités pour exposer facilement diverses molécules à la surface de particules de GFLV avec des stœchiométries variables, pouvant même être supérieures à 60 protéines recombinantes par particule en utilisant un cocktail de Nb ne reconnaissant pas le même épitope (notamment les Nb p75 et p59). Les VLP pourraient également permettre l'expression de protéines à la surface des particules virales à façon, tels que des Nb dirigés contre une cible d'intérêt, tout en permettant l'encagement d'une autre protéine telle qu'une toxine ou un marqueur, permettant le transport ciblé et protégé de ce type de molécules. Ces applications prometteuses dépendront de la capacité et de la facilité de production des VLP, qui font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet (n°15306396.1).

Ainsi, les Nb montrent encore une fois leur polyvalence, cette fois-ci dans le domaine de la phytopathologie, tant pour le diagnostic, pour la lutte antivirale que pour le suivi dynamique des virus *in vivo*. De nombreuses perspectives existent pour chacun des différents projets et ouvrent la voie à de nouvelles collaborations, notamment avec l'entreprise Bioreba. L'ensemble des travaux réalisés aussi bien à l'Inra de Colmar qu'à l'IBMP grâce à un financement CIFRE en partenariat avec l'IFV, mon employeur, montre que les Nb sont un véritable couteau-suisse, dont les nombreuses applications dans le domaine végétal sont loin d'être totalement exploitées et seront probablement nombreuses à venir.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. Plasmides

Les vecteurs suivants comportent une cassette de clonage de type Gateway® qui contient un gène de résistance au chloramphénicol et un gène suicide ccdB, à l'exception du vecteur d'expression pET22.

A. pDonRZeo

Ce vecteur d'entrée Gateway® porte une origine de réplication d'*E. coli* et confère une résistance à la zéocine. Il permet le clonage par recombinaison d'une séquence PCR d'intérêt et le passage aux vecteurs de destination également par recombinaison.

B. p0Gwa modifié

Ce vecteur de destination Gateway® porte un promoteur T7 qui permet l'expression des protéines clonées dans la cassette Gateway. Une séquence *Ribosome Binding Site* (RBS) ayant été identifiée en amont du site attB1 de la cassette de clonage Gateway® dans le vecteur p0GWA, les protéines produites contiennent la séquence attB1 en amont de la séquence d'intérêt. Cette séquence de 11 acides aminés pouvant modifier les caractéristiques des Nb, un vecteur p0GWA modifié ($p0Gwa_m$) a été construit en délétant la séquence RBS du vecteur p0GWA, en l'introduisant en aval du site attB1 et en amont de la séquence des Nb lors de la PCR. Il confère une résistance à l'ampicilline et a été utilisé pour la production périplasmique des Nb-6HisST.

C. pET22b(+)

Ce vecteur d'expression contient un promoteur T7, un *Mutiple Cloning Site* (MCS) qui permet l'introduction de séquences d'intérêt par restriction/ligation et le gène ampR qui confère une résistance à l'ampicilline. Ce vecteur a été utilisé pour la production des Cb et des Nb-PAL grâce aux sites de restriction Nde I et Xho I.

2. Souches bactériennes

Toutes les bactéries utilisées ont été transformées par choc thermique, comme décrit dans le paragraphe « Méthode » ci-après.

A. Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen)

Génotype : F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ$^-$

Les bactéries TOP10 ont été utilisées pour le clonage et l'amplification des plasmides cités précédemment. Elles sont sensibles au produit du gène ccdB permettant la sélection négative des plasmides après recombinaison Gateway®.

B. BL21(DE3) (Novagen)

Génotype : E. coli B F$^-$dcm ompT hsdSB(rB$^-$mB$^-$)galλ(DE3)

Cette souche bactérienne dérivant d'*E. coli* est utilisée pour l'expression et la production hétérologue de protéines. Elle a été utilisée pour la production périplasmique des Nb-6HisST et des Nb-PAL.

C. SHuffle T7 Express E.coli (Biolabs)

Génotype : F´ *lac*, *pro*, *lacI^Q / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK λatt*::pNEB3-r1-*cDsbC* (Spec^R, *lacI^q*) *ΔtrxB rpsL150*(Str^R) *Δgor Δ(malF)3*

Cette souche de bactéries porte deux mutations dans les gènes codant la thioredoxine réductase (trxB) et la glutathione réductase (gor) favorisant la formation de ponts disulfure dans le cytoplasme. Elle exprime également la disulfure isomérase DsbC qui participe au repliement correct des protéines. Cette souche bactérienne a été utilisée pour la production, des Nb-6HisST anti-GFLV de la famille 3 dont le rendement de production était faible en bactéries BL21 et a permis la production des Cb.

D. Bactéries TG1

Génotype : *supE thi-1Δ(lac-proAB)Δ(mcrB-hsdSM)5(r$_K^-$m$_K^-$) [F´traD36 proAB lacIqZΔM15]*

Cette souche de bactéries a été utilisée pour la production périplasmique des Nb anti-ArMV qui ont été utilisés pour le criblage d'une sélection d'isolats d'ArMV par PE-ELISA.

3. Milieux de culture

A. Milieu LB (Luria Bertani)

Ce milieu est un milieu nutritif classique pour la culture bactérienne. L'ajout d'antibiotiques spécifiques permet la sélection des bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt.

Composition : Bactotryptone 1% ; extrait de levures 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.4.

B. Milieu NZY

Le milieu NZY est un milieu riche auto-inductible utilisé pour la production de protéines. Ce milieu ne nécessite pas la surveillance de la croissance cellulaire, ni l'induction de la production des protéines par addition d'IPTG. Le glucose présent dans le milieu NZY est métabolisé préférentiellement par les bactéries en croissance, réprimant l'opéron lactose et la production des Nb sous cet opéron. Lorsque l'ensemble du glucose est épuisé, le lactose, également présent dans le milieu NZY, sera à son tour métabolisé, induisant l'opéron lactose et donc la production des protéines.

Composition : 1% NZ-amine, 0,5% extrait de levure, $MgSO_4$ 1mM, 25 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 50 mM de KH_2PO_4, 50 mM de Na_2HPO_4, 0,5% glycérol, 0,05% glucose, 0,2% d'alpha lactose. Mix minéraux (50 mM $FeCl_3$, 40 mM $CaCl_2$, 40 mM $MnCl_2$, 20 mM $ZnSO_4$, 4 mM $CoCl_2$, 8 mM $CuCl_2$, 4 mM $NiCl_2$, 2 mM Na_2MoO_4, 2 mM Na_2SeO_3, 2 mM MH_3BO_3) à diluer au 1 :1000.

C. Milieu TB (Terrific Broth)

Le milieu TB est un milieu LB enrichi qui permet d'atteindre des DO bactériennes plus élevées (jusqu'à 20 de DO) et donc une biomasse bactérienne plus importante que le milieu de culture LB. La plus grande proportion de tryptone et d'extrait de levures de ce milieu fournit des nutriments supplémentaires et des facteurs de croissance favorisant le développement bactérien. Le potassium ainsi que les phosphates sont présents pour maintenir le pH du milieu de culture au cours de la production.

Composition : 1.2% peptone, 2.4% d'extrait de levure, 72 mM K_2HPO_4, 17 mM KH_2PO_4 et 0.5% glycérol.

4. Plantes hôtes

Deux catégories de plantes hôtes infectées par le GFLV et/ou l'ArMV ont été utilisées.

A. Chenopodium quinoa

Hôte herbacée du GFLV et de l'ArMV, répondant à l'infection par l'apparition de symptômes sur les feuilles inoculées et systémiques sous la forme de lésion chlorotiques en mosaïque. Cet hôte a été utilisé pour la purification du GFLV-F13 et de l'ArMV-S mais a également été utilisé comme matériel végétal lors de test ELISA.

B. Vitis vinifera

Hôte ligneux du GFLV et de l'ArMV, répondant à l'infection de ces virus par l'apparition de symptômes dont la diversité est décrite dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Les vignes infectées par le GFLV et l'ArMV proviennent des collections de l'INRA de Colmar, de l'Institut Français de la vigne et du vin (IFV, Le Grau du Roi, France) ou de l'entreprise de phytodiagnostic Bioreba (Bioreba AG, Reinach, Suisse). Ces vignes infectées ont été utilisées pour l'évaluation du spectre de reconnaissance des Nanobodies dirigés contre le GFLV et l'ArMV.

C. Nicotiana benthamiana

Hôte herbacée du GFLV, répondant à l'infection par l'apparition de symptômes sur les feuilles inoculées et systémiques sous la forme de lésion en mosaïque pour l'isolat GFLV-GHu. Cet hôte a été utilisé comme matériel végétal lors de test ELISA.

5. ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés dans les plaques ELISA MaxiSorp^{TM} 96 puits (Nunc). Les anticorps conventionnels anti-GFLV et anti-ArMV utilisés sont les anticorps destinés à l'étape de coating et les anticorps conjugués à la Phosphatase alcaline commercialisés par l'entreprise Bioreba (Bioreba AG, Reinach, Suisse).

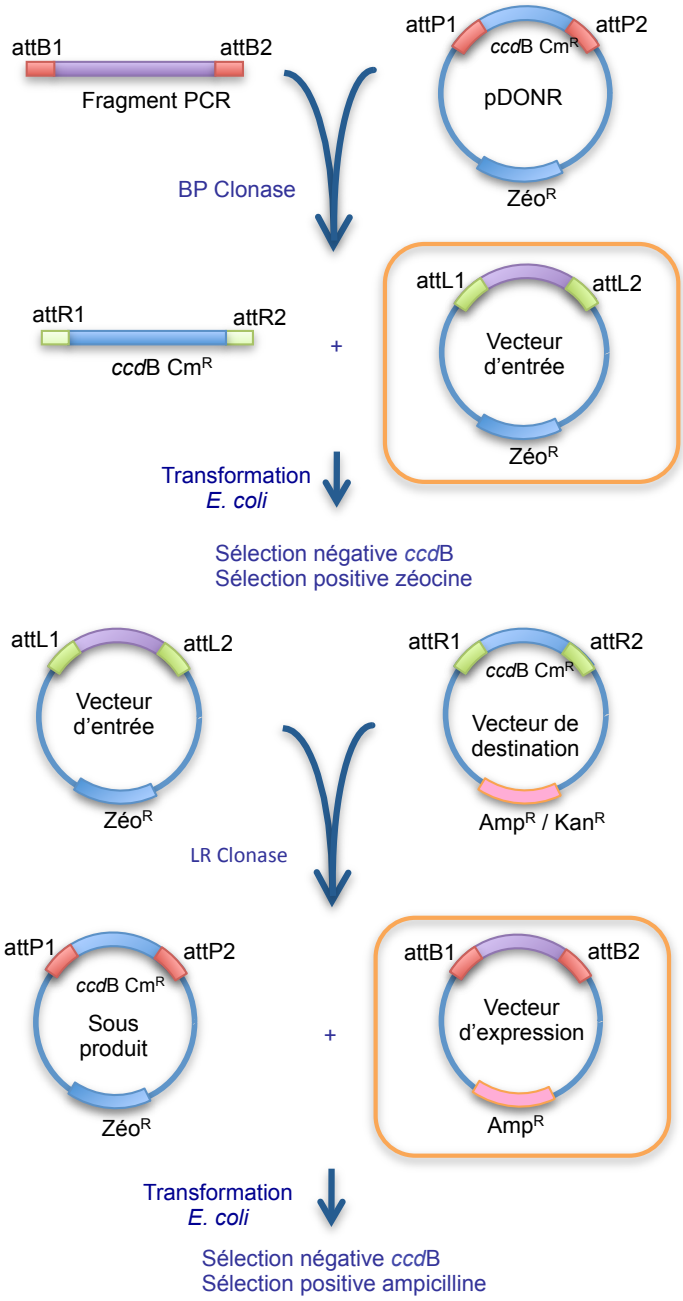


Figure MM.1 : Représentation schématique du système de clonage Gateway™ en deux étapes : une étape de recombinaison BP et une étape de recombinaison LR. att : séquences de recombinaison du phage λ, Cm^R, $Zéo^R$, Amp^R : gènes conférant respectivement la résistance au chloramphénicol, à la zéocine et à l'ampicilline, ccdB gène code pour un inhibiteur d'ADN gyrase.

6. Dynamic light scattering

L'homogénéité et la pureté des Nb a été vérifiée à 20°C grâce à l'appareil Wyatt Nanostar dans des cuvettes jetables de 4 µL en copolymère d'oléfine cyclique et celle du GFLV grâce à l'appareil Malvern Zetasizer NanoSZ dans des cuvettes en quartz de 20 µL.

7. Cristallographie

Les différentes conditions de cristallographie ont été réalisées à l'aide du crible commercial INDEX (Hampton Research). Les gouttes des différentes conditions ont été déposées en plaques 96 puits Grenier BioOne à l'aide de l'instrument Mosquito TTP (LabTech).

8. Outils informatiques

Blast : *blast.ncbi.nlm.nih.gov/*
Genbank : *www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/*
Swissmodel : *swissmodel.expasy.org*
Cluspro : *https://cluspro.bu.edu*

II. Méthodes

1. Clonage des Nanobodies

A. La technologie Gateway

La technologie Gateway® (Invitrogen) est une méthode de clonage basée sur le système de recombinaison site spécifique « att » du phage lambda (figure MM.1). Les expériences ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur. L'obtention d'un vecteur d'expression contenant le gène d'intérêt résulte de deux recombinaisons successives grâce à des sites att de quatre types : les sites attB, ajoutés par PCR, qui recombinent avec les sites attP portés par le vecteur d'entrée donnent les sites attL, qui recombinent avec les sites attR du vecteur de destination. Chacun de ces sites possède deux variants (par exemple attB1 et attB2 pour le site attB) qui permettent une recombinaison orientée. Ce système de clonage s'accompagne d'une double sélection des bactéries transformées par le milieu de

Tableau MM.1 : Liste des amorces nucléotidiques (nt) utilisées

Nom	séquence complète	nombre de nt total	nombre de nt complémentaires	Tm
AttB1pelB>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTatgaaatacctattgcctacgg	53	22	56.5
AttB1Nb>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGcaggtgcagctgcagg	50	16	56.9
NdeI-Nb>	TCAAATCATATGcaggtgcagctgcagg	28	16	56.9
NdeI-pelB-Nb>	AGACTACATatgaaatacctattgcctacggc	32	23	58.9
LinkerST-NtTagRFP>	TCTCATCCTCAATTTGAAAAAGGTCCatgagcgagctgattaaggaga	49	22	58.4
LinkerST-NtGST>	AAAGGATCCatgtcccctatactaggttattgga	34	25	59.7
Linker3GS3GBamHI-NtGST>	CGTCTCCTCAGGTGGCGGATCCGGCGGCGGTatgtcccctatactaggttattggaaa	58	27	60.4
Linker3GS3GBamHI-NtTagRFP>	CGTCTCCTCAGGTGGCGGATCCGGCGGCGGTatgagcgagctgattaagg	50	19	54.5
Linker3GSBamHI-PAI>	GGTGGCGGATCCCGTACCCCGGAAATGCCGgttctggaaaaccgggctgct	51	21	61.8
AttB2-StrepTagII<	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTTTTCAAATTGAGGATGAGACCAgtgatggtgatggtggtg	75	18	56.0
Xho-STOP-StrepTagIII<	TTTATTCTCGAGttatttttcaaattgaggatgagacc	38	26	56.9
XhoI-STOP-6His<	GTGACTCGAGTtagtgatggtgatggtgatg	31	20	55.3
Xho-Stop-6His-GST<	GTGACTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGatccgattttggaggatg	49	18	51.4
NbCt-Linker3GS3GBamHI-GST<	TAGGGGACATACCGCCGCCGGATCCGCCACCtgaggagacggtgacctg	49	18	58.2
NbCt-Linker3GS3GBamHI-TagRFP<	GCTCGCTCATACCGCCGCCGGATCCGCCACCtgaggagacggtgacctg	49	18	58.2
XhoI-6His-PAL<	GTGACTCGAGttaatggtgatggtgatggtgtttc	35	25	59.7
CtNb-LinkerST<	CTGGATCCTTTTTCAAATTGAGGATGAGACCACGCtgaggagacggtgacctg	53	18	58.2

Tableau MM.2 Conditions de PCR utilisées pour les différents clones

PCR pour obtenir	Matrice	Amorce sens	Amorce anti-sens	H	P
pelB Nb6HisST	pMECs-Nb	AttB1pelB>	AttB2-StrepTagII<	61°C	12 sec
Nb6HisST	pMECs-Nb	AttB1Nb>	AttB2-StrepTagII<	61.5°C	12 sec
Nb-3GS3G-TagRFP	pMECs-Nb	NdeI-Nb>	NbCt-Linker3GS3GBamHI-TagRFP<	63.3 °C	12 sec
	pDonR-TagRFP	Linker3GS3GBamHI-NtTagRFP>	XhoI-STOP-6His<	59.9°C	20 sec
Nb-3GS3G-GST	pDonR-GST	Linker3GS3GBamHI-NtGST>	Xho-Stop-6His-GST<	59.9°C	20 sec
Nb-3GS-PAL	pMECs-Nb	NdeI-pelB-Nb>	NbCt-Linker3GS3GBamHI-TagRFP<	63.3 °C	12 sec
	pLip6-PAL	Linker3GSBamHI-PAI>	Xho-PAL<	70°C	45 sec
Nb-ST-TagRFP	pMECS-Nb	NdeI-Nb>	CtNb-LinkerST<	63.3 °C	12 sec
	pDonR-TagRFP	LinkerST-NtTagRFP>	XhoI-STOP-6His<	59.9°C	20 sec
Nb-ST-GST	pDonR-GST	LinkerST-NtGST>	XhoI-STOP-6His<	59.9°C	20 sec

Tableau MM.3 Conditions générales de PCR (Phusion)

Cycle PCR	Température	Temps	
Dénaturation initiale	98°C	30 sec	
Dénaturation	98°C	10 sec	x5
Hybridation	H	15 sec	
Polymérisation	72°C	P	
Dénaturation	98°C	10 sec	x25
Hybridation	72°C	15 sec	
Polymérisation	72°C	P	
Polymérisation finale	72°C	5 min	

recombinaison : une sélection positive basée sur la résistance à un antibiotique et une contre-sélection liée à l'action létale de la protéine ccdB sur une gyrase cellulaire.

B. Conception des oligonucléotides et PCR

La conception des oligonucléotides respecte les recommandations du fournisseur (Invitrogen) et prévoit l'ajout de sites attB1 et attB2 respectivement en amont et en aval de la séquence d'intérêt. La liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau MM.1. Les conditions générales et particulières des PCR sont respectivement décrites dans les tableaux MM.2 et 3. L'ADN polymérase utilisée est la Phusion High Fidelity PCR (Finnzymes) qui est fidèle et processive. La température d'hybridation (H) dépend de la séquence de l'amorce (% en GC) et le temps d'élongation (E) de la taille de l'insert à amplifier (15 à 30 secondes par kb). Les fragments PCR obtenus sont ensuite purifiés par précipitation au polyéthylène glycol (10% PEG 8000, 10mM $MgCl_2$). La présence et la taille des amplicons sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose.

C. Recombinaison BP et LR

Dans un volume réactionnel de 10 µl, 150 ng du fragment d'ADN d'intérêt amplifié par PCR et flanqué des sites attB1 et attB2 du phage lambda sont mélangés avec 150 ng du vecteur pDonR. Le fragment d'intérêt est alors introduit dans le vecteur au niveau de ses sites attP grâce à la BP clonase par recombinaison. Après incubation à 25°C pendant 2 heures, la réaction est soumise à une digestion par la protéinase K avant d'être directement utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* TOP10. La recombinaison entre le clone d'entrée et le vecteur de destination, p0Gwa modifié, est réalisée dans les mêmes conditions, avec 150 ng de chaque vecteur dans une réaction de 10 µl, par la LR clonase. Les plasmides recombinants (vecteurs d'expression) sont amplifiés dans des bactéries TOP10, extraits et contrôlés par digestions enzymatiques et séquençage avant d'être transfectés aux bactéries BL21(DE3) utilisées pour la production de protéines.

D. Clonage des Cb, Nb-GST et des Nb-PAL par digestion/ligation

Les constructions codant pour les Cb, les Nb-GST et les Nb-PAL ont été réalisées par des PCR chevauchantes avec des oligonucléotides introduisant le site NdeI en amont du Nb et le site XhoI en aval des protéines étiquetées, introduites dans le vecteur pET22. Les Nb et les protéines porteuses (TagRFP, GST ou PAL) sont reliées par un peptide de liaison ou « *linker* » dont la séquence en acide aminé est $(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_3$ ou correspond à celle du StrepTagII. Un site de restriction BamHI a été introduit au niveau du *linker* pour les différentes constructions pour faciliter l'introduction rapide de différents Nb (NdeI-BamHI) ou de différentes protéines porteuses (BamHI-Xho) par clonage classique. Les digestions des fragments PCR et des vecteurs d'expression ont été réalisées selon les conditions préconisées par le fournisseur (FastDigest, Thermo Fisher). Les vecteurs ont été déphosphorilés par la FastAP (Thermo Fisher) puis le produit de digestion du vecteur a été déposé sur gel d'agarose. Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, le fragment d'ADN est découpé, extrait du gel, purifié (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Machery-Nagel) et quantifié. La ligation a été réalisée dans un volume final de 20 µl en présence de 100 ng de vecteur et du fragment PCR pour un ratio molaire insert/vecteur de 3:1 grâce à la T4 DNA ligase (Thermo Fisher) selon les recommandations du fournisseur. 10 µl de la ligation ont été utilisés pour transformer les bactéries TOP10.

E. Transformation des bactéries

Les bactéries utilisées (TOP 10, BL21(DE3) et SHuffle) ont été transformées par choc thermique. Pour cela, à 45 µl de bactéries thermo-compétentes sont ajoutés 50 ng d'ADN plasmidique ou la réaction de recombinaison traitée à la protéinase K. Le mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes. L'échantillon est ensuite incubé à 42°C au bain-marie pendant une minute pour les bactéries TOP10 et BL21 et 30 secondes pour les bactéries SHuffle, puis brutalement refroidi dans la glace. Les bactéries sont ensuite re-suspendues dans 700 µL de milieu LB et incubées une heure à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées en boîte de Petri sur du milieu LB-agar additionné de l'antibiotique de sélection (zéocine pour les pDonRZeo, carbénicilline pour le p0Gwa et le pET22). Les boites de Petri sont placées à 37°C pendant la nuit.

F. Criblage des colonies par PCR

Le criblage par PCR sur colonies consiste à vérifier la présence de l'insert dans le vecteur d'expression en réalisant une PCR directement sur un prélèvement de la colonie. Pour cela, un oligonucleotide ciblant une région de l'insert et un autre ciblant une région du vecteur ont été utilisés. Les bactéries provenant d'une colonie unique sont déposées dans le milieu PCR à l'aide d'un cure-dent ou d'un cône de 10 µl. La première étape du cycle PCR consiste en une dénaturation de 3 minutes à 95°C afin de lyser les bactéries et libérer leur ADN.

G. Extraction et purification des ADN plasmidiques

Le kit Nucleospin Plasmid (Macherey Nagel) a été utilisé pour faire les minipréparations d'ADN plasmidique. Chaque minipréparation provient d'une colonie isolée qui a été préalablement ensemencée en milieu LB liquide, additionné de l'antibiotique de sélection adéquat (zéocine ou carbénicilline).

H. Identification des clones recombinants

Les plasmides obtenus sont vérifiés par digestion enzymatique par des enzymes de restriction appropriées. Après purification, 0,5 µl de chaque minipréparation d'ADN plasmidique est incubé avec une enzyme de restriction choisie pour couper dans l'insert et/ou dans le vecteur. L'échantillon est ensuite déposé sur gel d'agarose (1 à 2% agarose dilué dans un tampon TBE 0,5X). Après l'électrophorèse à 100 V et coloration au bromure d'ethidium, les fragments d'ADN sont révélés sous UV. Si le profil de digestion est correct, le clone positif est envoyé à la plateforme de séquençage de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes afin de valider la séquence nucléotidique.

2. Expression et production des Nanobodies

A. En bactéries BL21 et milieu NZY

Une pré-culture de 5 colonies est réalisée dans 10 ml de LB additionné de 0.5% de glucose et de carbénicilline puis est mise en culture une nuit à 37°C sous agitation. Puis, la pré-culture est centrifugée 5 minutes à 4000 g et le culot bactérien est repris dans 5 ml de milieu LB .

400 ml de milieu NZY sont ensemencés avec la pré-culture pour à une DO_{600nm} de 0,02 finale. Les erlens sont incubés à 37°C pendant 4 heures puis à 21°C sur la nuit (environ 20 heures) sous agitation à 250 rpm. Ce milieu étant auto-inductible, il ne nécessite ni la surveillance de la DO_{600nm} de la culture, ni l'induction de la production de protéines.

B. En bactéries SHuffle et milieu TB

10 ml de LB additionnés de 0.5% de glucose et de carbénicilline sont ensemencés par 5 colonies puis incubés une nuit à 30°C sous agitation. Cette pré-culture est centrifugée 5 minutes à 4000 g et le culot est repris dans 5 ml de milieu LB.
400 ml de milieu TB sont ensemencés avec la pré-culture à une DO_{600nm} finale de 0,02. Les erlens sont placés à 30°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne 0,4-0,6 puis l'induction est réalisée par l'addition d'IPTG à une concentration finale de 0,3 mM. L'expression des protéines a lieu pendant la nuit à 18°C (environ 20 heures) sous agitation à 250 rpm.

3. Extraction des Nanobodies

A. Extraction périplasmique

Les extractions périplasmiques ont été réalisées pour la production des Nb-6HisST et des Nb-PAL produits en bactéries BL21(DE3). Les cultures bactériennes décrites dans le paragraphe précédent sont transférées en pot de 1L et centrifugées 25 minutes à 6000 g. Les bactéries sont ensuite re-suspendues dans 12 ml de TES pH 8 (Tris 0,2M, EDTA 0,5mM, sucrose 0,5M), transférées dans des tubes de type « falcon » de 50 ml puis agitées à 4°C. Après 1h30, 18 ml d'eau milliQ stérile sont ajoutés aux échantillons et l'agitation est poursuivie pendant 1h30 à 4°C. Les tubes « falcon » sont centrifugés à 18000 g pendant 20 minutes et le surnageant est transféré dans un tube « falcon » propre. L'extrait peut être conservé à -80°C jusqu'à la purification des extraits par chromatographie d'affinité.

B. Extraction cytoplasmique

Les extractions cytoplasmiques ont été réalisées pour certains Nb-6HisST et les Cb produits dans les bactéries SHuffle. Les cultures bactériennes décrites au paragraphe précédent sont transférées en pot de 1L et centrifugées 25 minutes à 6000 g. Les bactéries sont ensuite re-

suspendues dans 40 ml de Tris 100 mM additionné de 300 mM de NaCl, et mises sous agitation à 4°C pendant 1 heure. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication pendant 2 fois 2 minutes 30 (2 secondes *pulse on*, 3 secondes *pulse off*) avec une amplitude de 80% (Vibra cell 75115, Bioblock scientific), puis centrifugées à 18000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube « falcon » de 50mL propre et peut être conservé à -80°C jusqu'à la purification des extraits par chromatographie d'affinité.

4. Purification par chromatographie d'affinité (IMAC)

A. Purification sur colonne HisTrap

Avant la purification les extraits périplasmiques ou cytoplasmiques sont filtrés grâce à un support filtre 0.2 µm sous pression (SM 16249, Sartorius) et 25 mM l'imidazole sont ajoutés à l'échantillon pour limiter la fixation aspécifique de protéines. Les Nb-6HisST et les Cb sont purifiés grâce à leur étiquette 6His (colonne His-Trap 1ml GE Healthcare) assisté par l'appareil Äkta Purifier piloté par le logiciel UNICORN. Le tampon de conditionnement (IMAC A) de la colonne contient 50 mM de Tris pH 8, 300 mM de NaCl, et 5% de glycérol. Le tampon d'élution (IMAC B) contient 50 mM de Tris pH 8, 300 mM de NaCl, 500 mM d'imidazole et 5% de glycérol.

B. Purification sur colonne StrepTrap

Les Nb-6HisST ont également pu être purifiés grâce à leur StrepTag II (colonne Strep-Trap 1ml GE Healthcare) assisté par l'appareil Äkta Purifier piloté par le logiciel UNICORN. Le tampon de conditionnement (IMAC A) de la colonne contient 100 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 1 mM EDTA et 5% de glycérol. Le tampon d'élution (IMAC B) contient 100 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM de Destiobiotine et 5% de glycérol.

5. Chromatographie d'exclusion stérique (gel filtration)

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. La colonne Sephadex S75 (GE Healthcare) conditionnée dans du tampon PBS 1x a été utilisée pour la chromatographie des Nb et des Cb. Les fractions contenant les Nb sont rassemblées et la concentration des Nb est ajustée à 1mg/ml en utilisant des Centricon® (Merck Milipore) avec un seuil d'exclusion de 3 ou 5 kDa pour les NbST et de 20 ou 30 kDa

pour les Cb et les Nb-GST, les Nb-6HisST ayant un poids moléculaire entre 14 et 17kDa et les Cb et Nb-GST entre 40 et 45 kDa.

6. Dialyse des Nb-PAL

Les fractions contenant les Nb-PAL ont été dialysées dans des cassettes de dialyse (ThermoFisher, seuil d'exclusion 30 kDa) contre le tampon de stockage des Nb-PAL (35 mM HEPES pH 7.2 ; 150 mM KCl ; 50 mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 0.01 mM $ZnCL_2$).

7. Contrôle de l'expression des Nanobodies

A. Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont dilués volume à volume dans du tampon Laemmli (100 mM Tris-HCl pH 6.8, glycérol 10%, SDS 2%, β-Mercaptoéthanol 3%, 0.1% bleu de bromophénol) puis chauffés 5 minutes à 95°C.

B. Séparation des protéines par électrophorèse en gel dénaturant Tris-Tricine

Les protéines extraites des bactéries sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant Tris-Tricine. Ce gel se compose de deux couches successives qui différent par leur concentration en polyacrylamide. Le gel de concentration (4% acrylamide, 0,1% bisacrylamide, 430 mM Tris-HCl pH 8,45, 0,05% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% persulfate d'ammonium) permet de concentrer les protéines, qui seront ensuite séparées selon leur taille dans le gel de séparation (16 % acrylamide, 0,4% bisacrylamide, Tris-HCl 1M pH 8,45, 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% persulfate d'ammonium). La migration des protéines est réalisée dans un tampon de migration Anode Buffer pH 8,9 (Tris 100 mM, HCL 23mM) et Cathode Buffer pH 8,3 (Tris 0,1M, Tricine 0,1M, Glycine 192mM, 0,1% SDS). L'électrophorèse commence à un voltage de 80 V pendant le passage des protéines dans le gel de concentration puis le voltage est augmenté à 100 V dans le gel de séparation.

C. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le gel dénaturant SDS-PAGE est constitué de deux couches successives : le gel de concentration (4% acrylamide, 0,1% bisacrylamide, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, 0,1%SDS, 0,05% TEMED, 0,05% persulfate d'ammonium) permet de concentrer les protéines qui seront ensuite séparées selon leur taille dans le gel de séparation (12,5 % acrylamide, 0,3% bisacrylamide, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, 0 ,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% persulfate d'ammonium). La séparation des protéines est réalisée dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3, 192 mM Glycine, 0,1% SDS en appliquant un voltage de 80 V dans le gel de concentration et 100 V dans le gel de séparation pendant 1h30.

D. Coloration des protéines après migration

Les protéines sont visualisées après coloration avec une solution de coloration au bleu de Coomassie et décoloration dans une solution (7% acide acétique, 30% éthanol) ou grâce à une solution d'Instant Blue (Expedeon).

8. Test ELISA

A. Coating direct de virus purifiés

Les particules virales purifiées de GFLV ou d'ArMV sont adsorbées directement dans les puits des plaques ELISA 96 MaxiSorb™ (Nunc) dans du tampon PBS 1x pendant une nuit à 4°C. Les puits sont lavés dans du PBS 1x Tween-20 0,05% puis saturés avec du lait en poudre 1% dilué dans du PBS 1x, et la plaque est incubée pendant 1h à température ambiante.

B. Coating des anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux Bioreba anti-GFLV ou anti-ArMV permettant la capture des particules virales sont dilués au 1:1000 dans du tampon coating pH 9,6 (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$), déposés à hauteur de 100 µl dans des plaques ELISA 96 puits MaxiSorp™(Nunc) puis incubés à 37°C pendant 3 heures.

C. Coating des Chromobodies

L'efficacité de l'adsorption des Cb a été évaluée dans différentes solutions: i) le tampon coating commercial (tampon carbonate), ii) de l'eau milliQ autoclavée, iii) du tampon PBS 1X pH 7,4 ou iv) du tampon Tris 100 mM pH 8,3. Les Chromobodies ont été dilués dans ces différents tampons et déposés à hauteur de 100 µl dans les puits d'une plaque ELISA 96 puits MaxiSorp™ (Nunc). La plaque est incubée à 37°C ou à température ambiante pendant 3 heures. Après 3 lavages successifs des puits, la fluorescence émise par les Cb est mesurée grâce à l'appareil FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech) équipé de filtre d'excitation 485/12 nm et de filtre d'émission 520/25 nm.

D. Lavages des puits ELISA

Le lavage des puits ELISA est réalisé avec une solution PBS 1x Tween-20 0,05% pour les tests composés des anticorps classiques et des Nb-6HisST et par une solution de Tris 50 mM pH 8 200 mM KCl Tween 0,05% pour les tests réalisés avec les Nb-PAL.

E. Préparation des échantillons

Les échantillons vigne sont broyés dans du tampon broyage pH 8,2 (0,2M Tris, 0,14M NaCl, 0,5M PVP 40, 0,05% Tween-20) et les échantillons herbacés *C. quinoa* sont broyés dans du tampon phosphate M/20 pH 7 (35 mM Na_2HPO_4, 15 mM KH_2PO_4). Les échantillons feuilles sont broyés à raison de 1 g dans 5 ml de tampon de broyage (protocole INRA/IFV) ou de 1 g dans 20 ml de tampon de broyage (protocole Bioreba). Les échantillons bois sont découpés en très fines lamelles avec un sécateur, puis broyés à raison de 1 g pour 10 ml de tampon (protocole INRA/IFV) ou de 1 g pour 20 ml de tampon (protocole Bioreba). Les échantillons contenant le virus sont déposés à hauteur de 100 µl par puits et la plaque est incubée toute la nuit à 4°C.

F. Détection par les anticorps commerciaux

Les IgG conjugués anti-GFLV ou anti-ArMV Bioreba sont dilués dans du tampon conjugué INRA/IFV pH 7.4 (PBS 1x, BSA 0.1%, 0,05% Tween-20, 0,2% NaN_3) ou dans celui commercialisé par Bioreba (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 %

PVP 24kD, 0.05 % Tween-20, 0.2 % BSA). Les anticorps sont incubés pendant 2 heures (protocole INRA/IFV) à 5 heures (protocole Bioreba) à 30 ou 37°C. Lorsque les antigènes sont des particules virales purifiées, directement adsorbées dans les puits, l'addition des anticorps conjugués est précédée par une étape de saturation avec 1% de lait en poudre dissout dans le tampon conjugué.

G. Détection par les Nb-6HisST

Les Nb-6HisST sont dilués dans du tampon conjugué INRA/IFV (PBS 1x, BSA 0.1%, 0,05% Tween-20, 0,2% NaN_3) ou dans celui commercialisé par Bioreba (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 % PVP 24kD, 0.05 % Tween-20, 0.2 % BSA). Les Nb-6HisST sont incubés pendant 2 heures à température ambiante. Dans le cas de l'utilisation de virus purifiés directement adsorbés sur la plaque ELISA, les puits sont saturés avec une solution de lait 1% en poudre dilué dans le tampon conjugué avant l'utilisation des réactifs de détection. Pour la révélation du test, les puits sont lavés trois fois dans du PBS 1x Tween-20 0,05%, puis 100 µl de Sav-Pal (Jackson ImmunoResearch) diluée au 1/10000ème sont déposés. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante.

H. Détection par les Nb-PAL

Les Nb-PAL sont dilués dans le tampon conjugué Nanobodies (50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 % PVP 24kD, 0.05 % Tween-20, 0.2 % BSA). Puis les Nb-PAL sont déposés dans les puits à hauteur de 100 µl et la plaque ELISA est incubée pendant 2heures à température ambiante. Dans le cas de l'utilisation de virus purifiés adsorbés sur la plaque ELISA, les puits sont préalablement saturés avec une solution de lait en poudre 1% dilué dans le tampon conjugué.

I. Révélation du test ELISA

Après l'incubation des derniers réactifs, les puits sont lavés 3 fois et le substrat (pNPP 1 mg/ml) est déposé dans les puits à hauteur de 100 µl. Les plaques ELISA sont incubées au noir pendant 2 heures. La lecture des plaques est réalisée grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

9. Criblage des Nb anti-ArMV par PE-ELISA

A. Préparation des extraits périplasmiques

Les bactéries TG1 contiennent un plasmide pMECs portant les séquences des Nb et permettant leur adressage au périplasme *via* le peptide signal pelB. Une culture de 5 ml a été réalisée dans du milieu TB additionné de carbénicilline et l'expression des protéines a été induite à une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6 avec 0,5 mM d'IPTG. L'extraction périplasmique a été réalisée selon le protocole indiqué précédemment.

B. Test PE-ELISA

Les puits de plaques ELISA MaxiSorp^{TM} nunc 96 puits ont été tapissés avec des anticorps polyclonaux anti-ArMV (Bioreba) dilués au 1000eme dans du tampon coating pour permettre la capture des particules virales. La plaque a été incubée à 37°C pendant trois heures, puis les puits ont été lavés 3 fois dans du PBS Tween-20 0,05%. Les échantillons bois broyés ont ensuite été déposés et la plaque incubée à 4°C pendant la nuit. Après 4 lavages au PBSx1 Tween-20 0,05%, les extraits périplasmiques bruts sont déposés et la plaque est mise à incuber deux heures à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés trois fois dans du PBS 1x Tween-20 0,05%. Les anticorps anti-HA couplé à la peroxydase de raifort (anti-HA-HRP, Sigma) sont dilués au 1000eme dans du PBS 1x et déposés dans les puits. La plaque est mise à incuber une heure à température ambiante. Après trois lavages, le substrat (TMB 0,1 mg/ml, Acétate de sodium 100 mM pH 5,2, H_2O_2 0,01%) est déposé dans les puits et mis à incuber au noir. Après 1 heure puis 2 heures, la DO est mesurées à 650 nm au spectrophotomètre.

10. Purifications de virus

Entre 100 à 200 *Chenopodium quinoa* sont inoculés mécaniquement avec un inoculum composé de broyat de *C. quinoa* infecté. Chaque plante est inoculée au doigt après une légère abrasion des feuilles au carborundum. Après 2 semaines, les feuilles de *C. quinoa* montrant des symptômes sont prélevées puis broyées dans du tampon de broyage pH 7,0 (Na_2 HPO_4 65 mM ; NaH_2PO_4 65 mM ; EDTA 10 mM ; acide ascorbique 100 mM) dans un rapport poids/volume de 1/2,5 au mixeur. Le broyat est filtré sur double toile de coton. Au

volume total des broyats filtrés sont ajoutés 8% de bentonite activée. Le mélange est agité 15 minutes à température ambiante, puis centrifugé 15 minutes à 1900 g à 15°C. Le surnageant est récupéré, son volume mesuré, puis additionné de 1% de NaCl et de 10% de PEG 20 000. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le mélange est centrifugé 30 minutes à 10 000 g et à 15°C. Le culot est repris dans 1/25^{ième} du volume initial de tampon phosphate n°1 pH 7,0 (Na_2HPO_4 5 mM; NaH_2PO_4 5 mM ; EDTA 1 mM). Les débris insolubles sont éliminés par une centrifugation à basse vitesse pendant 10 minutes à 3645 g et à 4°C, avec décélération faible puis le surnageant est mis à centrifuger pendant 2 heures à 145 000 g à 5°C. Les culots sont repris dans du tampon phosphate n°2 pH 7,0 (Na_2HPO_4 5 mM ; NaH_2PO_4 5 mM) et incubés toute la nuit à 4°C.

Le jour suivant, les débris insolubles sont éliminés par une centrifugation à basse vitesse pendant 10 minutes à 3645 g à 4°C. Le surnageant est ultracentrifugé pendant 5 heures à 145 000 g sur 20 ml d'un coussin de saccharose 20% dissout dans du tampon 2. Les culots sont recouverts par du tampon phosphate n°3 pH 7,0 (Na_2HPO_4 15 mM ; KH_2PO_4 5 mM) et incubés la nuit à 4°C. Après la remise en suspension des culots, les débris insolubles sont éliminés par une centrifugation à basse vitesse pendant 10 mn à 3645 g à 4°C. Le surnageant est déposé sur un gradient continu de saccharose 30% (obtenu par congélation/décongélation d'une solution de saccharose 30% dissout dans le tampon phosphate n°2). Le gradient est ultracentrifugé 5 heures à 113 000 g à 5°C Le gradient est collecté par fraction de 2 mL qui sont analysées au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm. Les fractions pour lesquelles la DO_{260nm} et le rapport DO_{260nm}/ DO_{280nm} est maximal sont rassemblées, diluées au moins 5 fois dans du tampon phosphate n°3 et ultracentrifugées à 285 000 g pendant 2 heures à 5°C. Les culots sont repris dans le tampon phosphate n°3 et incubés la nuit à 4°C.

Le culot remis en suspension, puis transféré dans un tube eppendorf et centrifugé 10 minutes à 5000 g à 4°C pour éliminer les débris insolubles. Le surnageant déposé sur un gradient de saccharose discontinu (60% à 15% par palier de 5 en 5%) est ultracentrifugé 2h30 à 156 000 g à 4°C. Une bande blanche correspondant à l'accumulation de particules virales visible sous lumière blanche aux 2/3 du gradient est récoltée. Cette fraction est analysée au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm, diluée au moins 5 fois dans le tampon phosphate n°3 et le virus est culoté par une ultracentrifugation à 195 000 g pendant 2 heures à 5°C. Les culots sont repris dans un volume adapté de tampon phosphate n°3 ou

dans de l'eau milliQ autoclavée. Les préparations virales peuvent être conservées à 4°C ou à -20°C.

11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett (p-value>0,05), par le test Anova. Le test Anova est un test paramétrique, qui permet de savoir si une valeur du test est significativement différente des autres. Si tel est le cas (p-value<0,05) le test de Tukey a été réalisé pour comparer les échantillons deux à deux. Le test de Student a également été réalisé pour comparer les valeurs de deux échantillons. Pour ces tests statistiques, on considère que si les p-value sont inférieures à 0,05, les échantillons sont significativement différents.

12. Expériences de *Dynamic light scattering* (DLS)

A. Effet du pH sur la capside virale

Le virus GFLV-F13 est dilué à 0,05 mg/ml dans 40 µL de différents tampons: i) 50 mM Acide acétique **pH 3,9** additionné de 100 mM NaCl ; ii) 50 mM Acide acétique **pH 5,3** additionné de 100 mM NaCl ; iii) 50 mM HEPES **pH 7.4** additionné de 100 mM NaCl ; iV) 50 mM Tris **pH 8.3** additionné de 100 mM NaCl ; v) 50 mM CHES **pH 9.5** additionné de 100 mM NaCl ; vi) 50 mM CAPS **pH 11** additionné de 100 mM NaCl. Les mesures de DLS ont été réalisées à 24 heures, 6 jours, 12 jours et 30 jours. Durant cette période les solutions virales sont conservées à 20°C.

B. Titration du GFLV par les Nanobodies

Le GFLV et les Nb purifiés sont préalablement ultracentrifugés à 100 000 g pendant 3 minutes afin de culotter les éventuels poussières et agrégats. Le surnageant est transféré dans un tube eppendorf propre, préalablement soufflé à l'air sous pression. L'homogénéité des deux préparations est mesurée par diffraction de lumière. Le virus et les Nb ont été dilués à une concentration de 0,1 mg/ml et de 0,01 mg/ml respectivement dans plusieurs solutions afin de déterminer les conditions optimales d'observation du complexe en DLS : i) 50 mM d'acide acétique pH 5,3 additionné de 150 mM de NaCl ; ii) 50 mM HEPES pH 7,4 additionné de 150 mM de NaCl et iii) 50 mM Tris pH 8,3 additionné de 150 mM de NaCl. En

premier lieu, 50 µL de virus à 0,1 mg/ml sont analysés grâce à l'appareil Zetasizer NanoSZ puis les Nb à la concentration de 0,01 mg/ml sont ajoutés par palier jusqu'à atteindre une stœchiométrie de 100 Nb par particule virale.

13. Cryo-électromicroscopie

Dans un tube eppendorf, sont mélangés 35 µg de GFLV-F13 purifié, 7,5 µg de Nb 23 purifié dans 100 mM de tampon Tris pH 8.3, 150 mM NaCl. À partir de ce mélange, 2,5ul de l'échantillon est déposé sur une grille de carbone (Quantifoil Micro Tools, Jena, Allemagne) préalablement démagnétisée, dans l'appareil VITRobbot (FEI, Eindhoven, Pays-Bas). L'échantillon est plongé dans de l'éthane rendu liquide grâce à un bain d'azote liquide, (Température de 20 °C, 99% d'humidité, blot force 4, blot time 0.5 secondes). Les échantillons ont ensuite été montés sur le support du microscope Polara TF30 D320 puis du microscope Titan Krios (FEI, Eindhoven, Pays-Bas) et observés sous 300 kVolt.

Annexes

Journal of General Virology (2013), **94**, 2803–2813 DOI 10.1099/vir.0.057646-0

A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of grapevine fanleaf virus determines symptoms in *Nicotiana* species

Emmanuelle Vigne,[1,2] John Gottula,[3] Corinne Schmitt-Keichinger,[4] Véronique Komar,[1,2] Léa Ackerer,[4] Lorène Belval,[1,2] Lalaina Rakotomalala,[1,2] Olivier Lemaire,[1,2] Christophe Ritzenthaler[4] and Marc Fuchs[3]

Correspondence
Marc Fuchs
marc.fuchs@cornell.edu

[1]INRA, UMR 1131 'Santé de la Vigne et Qualité du Vin', 68021 Colmar, France

[2]Université de Strasbourg, UMR 1131 'Santé de la Vigne et Qualité du Vin', 68021 Colmar, France

[3]Department of Plant Pathology and Plant–Microbe Biology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

[4]Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

Received 29 July 2013
Accepted 1 October 2013

Factors involved in symptom expression of viruses from the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae* such as grapevine fanleaf virus (GFLV) are poorly characterized. To identify symptom determinants encoded by GFLV, infectious cDNA clones of RNA1 and RNA2 of strain GHu were developed and used alongside existing infectious cDNA clones of strain F13 in a reverse genetics approach. *In vitro* transcripts of homologous combinations of RNA1 and RNA2 induced systemic infection in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana clevelandii* with identical phenotypes to WT virus strains, i.e. vein clearing and chlorotic spots on *N. benthamiana* and *N. clevelandii* for GHu, respectively, and lack of symptoms on both hosts for F13. The use of assorted transcripts mapped symptom determinants on RNA1 of GFLV strain GHu, in particular within the distal 408 nt of the RNA-dependent RNA polymerase ($1E^{Pol}$), as shown by RNA1 transcripts for which coding regions or fragments derived thereof were swapped. Semi-quantitative analyses indicated no significant differences in virus titre between symptomatic and asymptomatic plants infected with various recombinants. Also, unlike the nepovirus tomato ringspot virus, no apparent proteolytic cleavage of GFLV protein $1E^{Pol}$ was detected upon virus infection or transient expression in *N. benthamiana*. In addition, GFLV protein $1E^{Pol}$ failed to suppress silencing of EGFP in transgenic *N. benthamiana* expressing EGFP or to enhance GFP expression in patch assays in WT *N. benthamiana*. Together, our results suggest the existence of strain-specific functional domains, including a symptom determinant module, on the RNA-dependent RNA polymerase of GFLV.

INTRODUCTION

Mechanisms of symptom expression following plant–virus interaction are poorly understood although remarkable advances have been made for a few viruses (Culver & Padmanabhan, 2007; Dunoyer & Voinnet, 2005; Whitham & Wang, 2004). Several viral proteins such as the movement protein (Lewsey *et al.*, 2009; Rao & Grantham, 1995; Scholthof *et al.*, 1995), the helper component-proteinase (HC-Pro) (Shiboleth *et al.*, 2007), the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Kagiwada *et al.*, 2005; Padmanabhan *et al.*, 2005), the capsid protein (CP) (Heaton *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2005) and pathogenicity proteins (Jupin *et al.*, 1992; Pfeffer *et al.*, 2002) have been identified as symptom determinants. Many viral proteins involved in symptom expression such as the HC-Pro of potyviruses, 2b of cucumoviruses, P19 of tombusviruses, P0 of poleroviruses, 130K protein of tobamoviruses and CP of carmoviruses are virus-encoded suppressors of RNA silencing (VSRs) (Voinnet, 2005). The precise role of VSRs in eliciting symptoms remains unclear although the VSR activity itself does not always play a direct role (Díaz-Pendón & Ding, 2008; Haviv *et al.*, 2012).

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the GFLV-GHu RNA1 sequence is JN391442.

Five supplementary tables are available with the online version of this paper.

Our knowledge of symptom determinants and VSRs of viruses from the genus *Nepovirus*, family *Secoviridae*, is very limited. Recovery, a phenomenon whereby the initial symptomatic infection is followed by attenuation or elimination of symptoms in newly emerging leaves, was first described 85 years ago for a nepovirus (Wingard, 1928). RNA silencing, an innate plant defence mechanism, is associated with this phenomenon (Jovel *et al.*, 2007, 2011; Ratcliff *et al.*, 1997). However, whereas VSRs are well described in most plant virus genera, their identification in nepoviruses is pending.

Nepoviruses have a bipartite single-stranded positive-sense RNA genome (Sanfaçon *et al.*, 2009), and earlier studies with pseudorecombinants from distinct strains of raspberry ringspot virus (RpRSV) showed that: (i) RNA2 causes systemic yellowing in *Petunia hybrida*, (ii) RNA1 is responsible for the severity of systemic symptoms in *Chenopodium quinoa* and (iii) both RNA species determine the type of local lesions in *C. quinoa* (Harrison *et al.*, 1974). Similar conclusions were obtained with tomato black ring virus (TBRV) (Harrison & Murant, 1977). More recently, the 5′ untranslated region (5′UTR) of grapevine chrome mosaic virus (GCMV) was shown to induce necrotic symptoms in *Nicotiana* spp. when expressed from a heterologous viral vector. However, because typical GCMV symptoms were not reproduced, this sequence may not act as a dominant determinant of symptomatology (Fernandez *et al.*, 1999).

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is a member of the nepovirus subgroup A (Sanfaçon *et al.*, 2009). This virus causes fanleaf disease, one of the most detrimental viral diseases of grapevines worldwide (Andret-Link *et al.*, 2004a). The two GFLV genomic RNAs are covalently linked at their 5′ end to a viral genome-linked protein (VPg) and possess a poly(A) tail at the 3′ end. Each RNA contains a single ORF flanked by 5′- and 3′UTRs. Encoded polyproteins are proteolytically processed into functional proteins by the RNA1-encoded proteinase ($1D^{Pro}$) (Andret-Link *et al.*, 2004a). RNA1 codes for proteins involved in replication and polyprotein maturation, whereas RNA2 codes for proteins involved in virus movement and RNA encapsidation (Fig. 1). Both genomic RNA species are necessary for systemic plant infection (Viry *et al.*, 1993).

GFLV strains GHu and F13 show a differential reaction on *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana clevelandii*, two systemic hosts. Whilst strain GHu induces vein clearing on *N. benthamiana* and chlorotic spots on *N. clevelandii*, strain F13 causes an asymptomatic infection on both *Nicotiana* spp. These distinct phenotypes were exploited to investigate the GFLV determinants of symptomatology using cDNAs of strains GHu and F13 and transcripts derived thereof in a reverse genetics approach. Here, we show that the 3′ end of the GFLV-GHu RdRp coding region determines symptoms in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* but does not seem to act as a VSR or to be proteolytically processed.

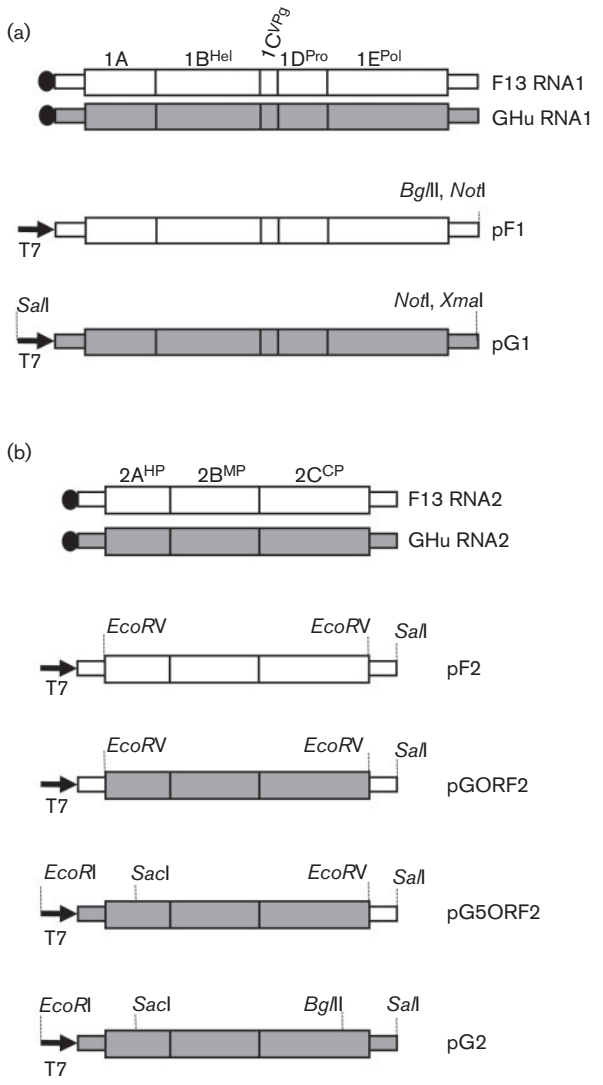


Fig. 1. Schematic representation of GFLV (a) RNA1 and (b) RNA2 and infectious clones derived from GFLV-F13 (open boxes) and GFLV-GHu (shaded boxes). Large open boxes indicate open reading frames with the processed proteins above (Hel, putative helicase; VPg, viral protein genome-linked; Pro, proteinase; Pol, RdRp; HP, putative homing protein; MP, movement protein; CP, capsid protein). Small open boxes denote the 5′ and 3′ UTRs and black circle represents the VPg. Plasmids are named with letters and numbers corresponding to the GFLV strains (F for F13 and G for GHu) and to the RNA species (1 for RNA1 and 2 for RNA2). The T7 promoter is represented by a black arrow, and the position of the restriction sites used for cloning and/or linearization is indicated by dashed lines.

RESULTS

Phenotypic and genetic differences between GFLV strains F13 and GHu

GFLV strains F13 and GHu induced a persistent systemic infection on *N. benthamiana* and *N. clevelandii*, as

indicated by double-antibody sandwich (DAS) ELISA in upper uninoculated leaves (data not shown). Whilst inoculated leaves remained asymptomatic with both strains, GFLV-GHu caused a symptomatic infection on *N. benthamiana* that usually started with a mild vein chlorosis at 6 days post-inoculation (p.i.) followed by a partial leaf chlorosis and mottling that vanish by 20 days p.i. In *N. clevelandii*, GFLV-GHu induced chlorotic spots at 6 days p.i.; these persisted for at least 20 more days. In contrast, no symptoms were visible for GFLV-F13 on *N. benthamiana* or *N. clevelandii* (Fig. 2).

The nucleotide sequence of GFLV-F13 RNA1 (Ritzenthaler *et al.*, 1991) and RNA2 (Serghini *et al.*, 1990) as well as of GFLV-GHu RNA2 (Vigne *et al.*, 2008) has been reported previously. Prior to investigating the viral symptom determinants, the full-length cDNA of GFLV-GHu RNA1 was synthesized by immunocapture (IC)-reverse transcription (RT)-PCR. Its sequence was 7342 nt like the RNA1 of strain F13 (GenBank accession no. NC_003615). The 242 nt RNA1 5′UTR of GFLV-GHu contains predicted stem–loop motifs (GYGTTTAAGAAACRC) that are also present on the RNA2 5′UTR (Vigne *et al.*, 2008). RNA segments corresponding to polyprotein P1 of GFLV-GHu and -F13 share 88/93 % identity at the nucleotide/amino acid levels, respectively, particularly 90/91 % in the 1A-coding region, 89/97 % in the $1B^{Hel}$ coding region, 90/100 % in the $1C^{VPg}$ coding region, 89/97 % in the $1D^{Pro}$ coding region and 85/88 % in the $1E^{Pol}$ coding region. This identity range is similar for the other four GFLV strains for which complete RNA1 sequence information is available (GenBank accession nos JX513889, JF968120, GQ332373 and GQ332372) (Lamprecht *et al.*, 2012; Mekuria *et al.*, 2009). Intraspecies recombination was detected in GFLV-GHu RNA1 in the 3′ end of the $1E^{Pol}$ coding region and 3′UTR (nt 6701–7313) with strain F13 as a major parent and an unknown minor parent using RDP v3.41 (Martin *et al.*, 2005). A similar recombination site was previously reported for GFLV strain SAPCS3 (Lamprecht *et al.*, 2012).

Symptom determinants in *Nicotiana* spp. map to GFLV-GHu RNA1

Infectious cDNA clones of GFLV-GHu RNA1 (pG1) and RNA2 (pG2) were produced and used alongside infectious cDNA clones of GFLV-F13 RNA1 (pF1) and RNA2 (pF2) (Viry *et al.*, 1993) to identify symptom determinants (Fig. 1). The integrity of the four cDNA clones was verified by DNA sequencing. A few single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were found, most of which were silent, and only 15 affected the amino acid composition (Tables S1 and S2, available in JGV Online). In agreement with previous reports (Andret-Link *et al.*, 2004b; Schellenberger *et al.*, 2010), *in vitro*-synthesized transcripts derived from plasmids pF1 and pF2 were infectious and caused an asymptomatic infection in *N. benthamiana* and *N. clevelandii*, as did WT GFLV-F13 (Table 1, Fig. 2). Importantly, G1/G2 transcripts reproduced the symptoms

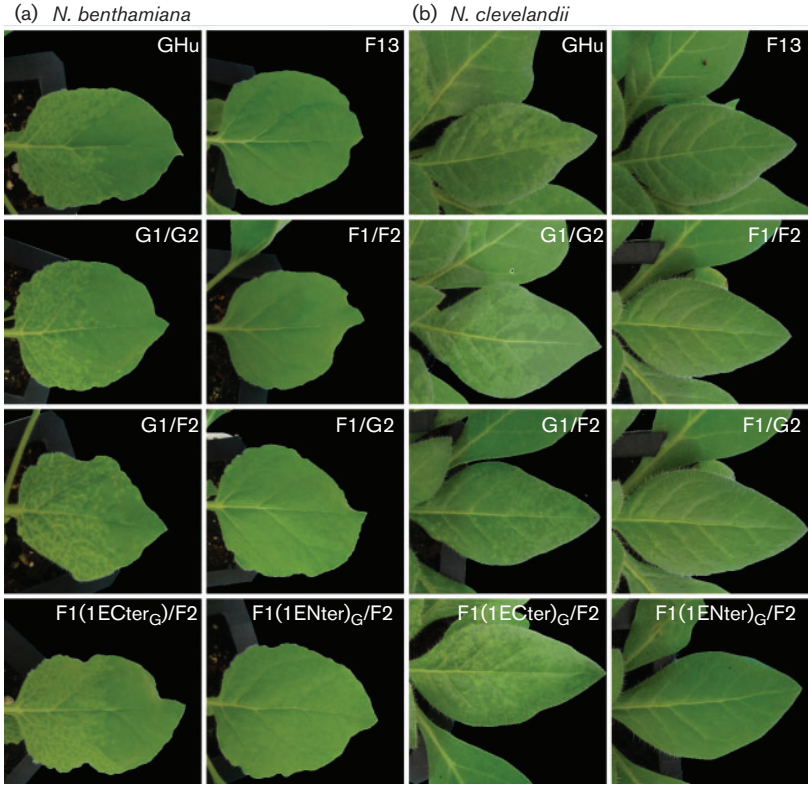


Fig. 2. Systemic symptoms induced by WT GFLV-GHu and -F13 and synthetic and chimaeric viruses on *N. benthamiana* (a) and *N. clevelandii* (b) at 6–12 days p.i. See legend of Fig. 3 for a description of the viruses.

observed with GFLV-GHu in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* (Table 1, Fig. 2).

To map the GFLV-GHu symptom determinants, the phenotype induced by transcripts of assortants F1/G2 and G1/F2 was investigated. Both combinations caused a systemic infection, but only G1/F2 displayed typical GHu symptoms on the two hosts, whilst F1/G2 remained asymptomatic (Table 1, Fig. 2). These results indicated that GFLV-GHu RNA1 encodes the symptom determinants. Consequently, GFLV RNA2 was excluded from further investigation.

The 3′ end of the GFLV-GHu 1E^{Pol} coding region elicits symptoms on *Nicotiana* spp.

To further delineate the symptom determinants on GFLV-GHu RNA1, a series of chimaeric RNA1 cDNAs between strains GHu and F13 was created. Plasmids pF1s and pG1s were first produced with an extraneous *Sna*BI restriction site to facilitate the engineering of chimaeric RNA1 constructs. Transcripts derived from these two plasmids induced the same reactions as strains GHu and F13 on *N. benthamiana* and *N. clevelandii* (Fig. 3). Eight chimaeric RNA1 constructs were then produced by exchanging full-length or partial fragments of coding regions between the cDNAs of strains F13 and GHu using *Sna*BI and other restriction sites (Fig. 3). Transcripts derived thereof produced systemic infections on herbaceous hosts when inoculated with either F2 or G2, as indicated by DAS-ELISA performed on apical leaves at 12–16 days p.i. (data not shown).

Transcripts G1(5′1AB)$_F$, F1(1E3′)$_G$ and F1(1E)$_G$ caused symptoms on *N. benthamiana* and *N. clevelandii*, whilst transcripts F1(5′1AB)$_G$, F1(1BCD)$_G$ and G1(1E)$_F$ were asymptomatic (Fig. 3), indicating that the region corresponding to the 1E^{Pol} coding region of GFLV-GHu is the sole symptom determinant in these two hosts (Fig. 3). Symptomatic recombinant viruses caused typical GFLV-GHu symptoms, although the onset of symptom development varied from 7 to 10 days p.i. Furthermore, the exchange between the 5′ (nt 4623–6650) and 3′ (nt 6663–7094) parts of the 1E^{Pol} coding region indicated that only transcripts F1(1ECter)$_G$ induced typical GHu symptoms, whilst no symptoms were observed for transcripts F1(1ENter)$_G$ (Figs 2 and 3). These findings are consistent with the fact that the distal 432 nt of the GFLV-GHu 1E^{Pol} coding region carry the symptom determinants. As the first 24 of these 432 nt are strictly conserved between strains F13 and GHu, we concluded that the ultimate 408 nt or 136 aa of the GFLV-GHu 1E^{Pol} coding region elicit symptoms on *N. benthamiana* and *N. clevelandii*. In this region, nucleotide and amino acid sequence conservation is substantially lower (70.3 and 64.7 %, respectively) than within the complete 1E^{Pol} coding region (85.0 and 88.2 %, respectively) of GFLV strains GHu and F13. Reduced conservation is also observed with equivalent regions from other GFLV strains for which sequence information is available in GenBank with 62–77 % and 60–74 % nucleotide and amino acid identities, respectively (Lamprecht *et al.*; 2012, Mekuria *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2010).

The progeny of chimaeric viruses F1(1E)$_G$ and F1(1ECter)$_G$ in the presence of F2 was characterized by IC-RT-PCR and sequencing to determine their stability. The nucleotide sequence from the progeny of F1(1E)$_G$ in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* was as expected. In contrast, one SNP (C^{6210} instead of T^{6210}) was observed on both hosts for the progeny of F1(1ECter)$_G$. This SNP led to a $S^{1990}P$ change, restoring the original F13 sequence, which was mutated at this position in pF1, but without recovering the asymptomatic phenotype (Table S1).

Table 1. Symptoms of WT, synthetic and assortant GFLV in systemically infected *N. benthamiana* and *N. clevelandii*

Results are shown as the percentage of infected plants showing vein clearing, mottling or discoloration (*N. benthamiana*) or chlorotic spots (*N. clevelandii*), and reacting positively to GFLV antibodies in DAS-ELISA. Numbers in parentheses correspond to the number of plants tested in at least three independent experiments. Note that asymptomatic plants reacted positively to GFLV antibodies in DAS-ELISA.

Inoculum*	*N. benthamiana*	*N. clevelandii*
WT F13	0 % (37)	0 % (33)
WT GHu	100 % (37)	100 % (35)
Synthetic F1F2	0 % (23)	0 % (35)
Synthetic G1G2	100 % (24)	100 % (21)
Assortant G1F2	100 % (24)	100 % (21)
Assortant F1G2	0 % (24)	0 % (19)

*Crude sap of *C. quinoa* infected with WT (F13 and GHu), synthetic (F1/F2 and G1/G2) and assortant (G1/F2 and F1/G2) GFLV was used as inoculum. Each RNA is designated a letter referring to strain F13 (F) or GHu (G), and a number to refer to RNA1 (1) or RNA2 (2).

Characterization of GFLV-GHu protein 1E^{Pol}

The complete GFLV-GHu protein 1E^{Pol} has identities ranging from 39 to 84 % with the RdRp of several viruses in the family *Secoviridae*. The seven conserved signature RdRp motifs (^{195}TPKDERL^{201}, ^{210}GTRLFSVLPLAYNLLLRVKFL-SFSRLLMKK^{239}, ^{246}QVGINPYSREW^{256}, ^{273}CDYKAFDGL-IT^{283}, ^{328}TEAGIPSGCALTVVLNS^{344}, ^{373}LITYGDDNVF^{382} and ^{427}LEFLKRG^{433}) commonly described for plant viruses (Chisholm *et al.*, 2007) are located upstream of the distal 136 aa of GFLV-GHu protein 1E^{Pol} (residues 689–824). Interestingly, the latter 136 residues have no significant match with known proteins, except with protein 1E^{Pol} of arabis mosaic virus (GenBank accession no. NC_006057) and grapevine deformation virus (GenBank accession no. HE613269), two other subgroup A nepoviruses (48–60 % amino acid identities). Furthermore, putative helix–loop–helix proteins, RNA recognition motif and zinc fingers were found within the GFLV-GHu protein 1E^{Pol} C terminus with

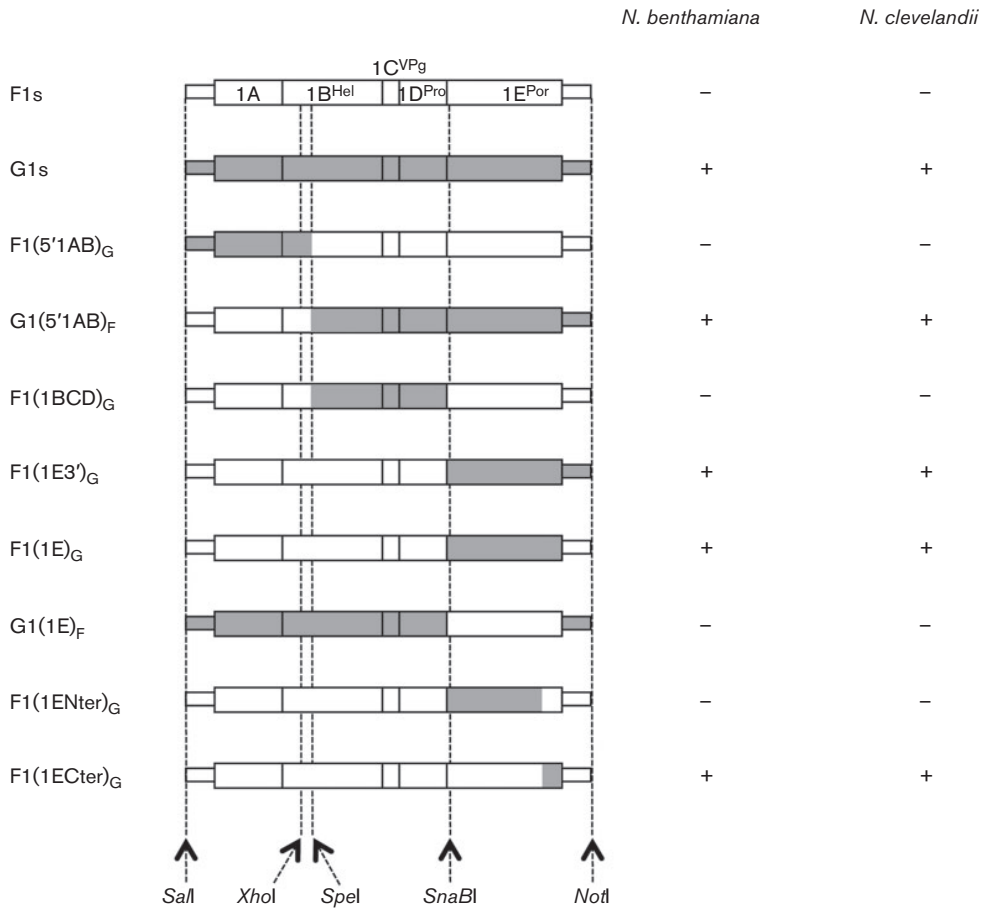


Fig. 3. Systemic symptoms induced by WT, mutated and chimaeric GFLV RNA1 on *N. benthamiana* and *N. clevelandii* in the presence of GFLV-F13 or -GHu RNA2 at 6–12 days p.i. The name of transcripts is the same as for plasmids (for example, F1 is the transcript from pF1). GFLV-F13 and -GHu sequences are in open and shaded boxes on the genetic map of RNA1, respectively. Restriction sites used for the creation of chimaeric clones are denoted. The presence (+) or absence (−) of viral symptoms in 5–20 plants in at least two independent experiments is indicated. The insertion of *Sna*BI introduced a silent nucleotide modification at nt 4638 for GFLV-F13 RNA1 in pF1 and at nt 4640 for GFLV-GHu RNA1 in pG1 (nucleotide positions are given according to the GFLV-F13 RNA1 sequence, GenBank accession no. NC_003615). For each plasmid, the information in parentheses indicates the region that was swapped in a pF1 or pG1 backbone plasmid, and letters G and F as subscripts refer to the origin of the region exchanged with G standing for GHu and F for F13. For example, G1(5′1AB)$_F$ contains the 5′UTR, the 1A-coding region, and the 5′ part of the 1B^{Hel}-coding region of GFLV-F13 in a GFLV-GHu RNA1 cDNA in plasmid pG1.

the protein domain annotation SMART (Letunic *et al.*, 2012) but E-values were poor (4×10^2–3×10^4).

A putative proteolytic cleavage site was identified within GFLV-GHu and -F13 protein 1E^{Pol} at position G^{704}/E^{705} using conserved motifs described previously (Andret-Link *et al.*, 2004a). This site could theoretically release a 13.2 kDa C-terminal peptide and a 79 kDa N-terminal peptide. To test whether the GFLV-GHu protein 1E^{Pol} segment responsible for symptom development accumulates as a final maturation product or is proteolytically cleaved at the C-terminal region like the RdRp of tomato ringspot virus (ToRSV) (Chisholm *et al.*, 2007), Western blots were performed on total proteins from infected plants and agroinfiltrated patches with an antiserum specific to GFLV protein 1E^{Pol}. These antibodies detected the mature protein of about 92 kDa with no intermediate maturation product in plants infected with GFLV-GHu or -F13 (Fig. 4a). The transient assay based on agroinfiltration was then used to characterize protein 1E^{Pol} in the presence or absence of GFLV proteinase 1D^{Pro}. Again, only a GFLV-GHu protein 1E^{Pol} of the expected size was detected and no shorter product was visualized (Fig. 4a), whether the proteinase was co-expressed or not. The functionality of GFLV-1D^{Pro} was confirmed by cleavage of the tagged construct EGFP–2B^{MP} containing a C/A cleavage site between the reporter EGFP and protein 2B^{MP} (Fig. 4b). To verify that the apparent lack of maturation was not due

to a loss of immunogenicity of the N terminus of protein $1E^{Pol}$ that is recognized by the $1E^{Pol}$ antiserum, a 1E–EGFP fusion was produced. Again, no additional cleavage of protein $1E^{Pol}$ from GFLV-GHu was detected using anti-GFP mAbs, regardless of whether the proteinase was added or not (Fig. 4b). These results showed that symptom expression probably does not result from a GFLV-GHu protein $1E^{Pol}$ maturation and subsequent release of a hitherto unidentified product by GFLV protein $1D^{Pro}$ or an endogenous proteinase *in planta*. Despite a higher relative accumulation of GFLV-GHu protein $1E^{Pol}$ following ectopic expression compared with viral infection (Fig. 4a), no symptoms were observed in agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana*.

GFLV protein $1E^{Pol}$ does not seem to be a VSR

To test whether GFLV-GHu protein $1E^{Pol}$ has VSR activity, several agroinoculation patch assays were employed in *N. benthamiana*. In the first procedure, silencing of EGFP in transgenic *N. benthamiana* was pre-established using tobacco rattle virus (TRV) RNA2–EGFP as an inducer of gene silencing (Fig. 5a, upper panel). In the second procedure, EGFP silencing was established from a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S expression cassette (Fig. 5a, lower panel). In both assays, agroinfiltration with GFLV-GHu $1E^{Pol}$ did not result in significant elevation of EGFP fluorescence, and protein $1E^{Pol}$ of GFLV-GHu and -F13 behaved similarly to the cucumber mosaic virus (CMV) CP, a non-VSR control, whilst known VSRs, e.g. 2b of CMV and p24 of grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2), showed elevated fluorescence, as expected. In a third procedure using WT *N. benthamiana*, neither GHu nor F13 protein $1E^{Pol}$ boosted expression of GFP, as did CMV 2b, although both GFLV proteins were readily detected in agroinfiltrated patches by Western blotting (Fig. 5b). These three independent experiments indicated no detectable VSR activity associated with protein $1E^{Pol}$ of GFLV-GHu and -F13.

Symptom expression in *Nicotiana* spp. is not associated with GFLV accumulation

To determine whether symptom expression was related to virus titre, the level of accumulation of WT, mutated and chimaeric viruses was determined in infected *N. benthamiana* and *N. clevelandii* at 13 days p.i. by semi-quantitative DAS-ELISA. In a preliminary assay, crude sap of healthy *N. benthamiana* and *N. clevelandii* was spiked with known amounts of purified virions and assessed by testing serial dilutions of GFLV-GHu and -F13. No statistically significant difference in the detection of strains GHu and F13 was obtained (data not shown), validating our semi-quantitative DAS-ELISA procedure.

In *N. benthamiana*, GFLV accumulation ranged from 18 ± 4 to 58 ± 23 μg g^{-1} in symptomatic plants infected with strains GHu, G1/G2, G1/F2, $F1(1E)_G$/F2, and $F1(1ECter)_G$/F2, and from 24 ± 6 to 35 ± 3 μg g^{-1} in asymptomatic plants infected with strains F13, F1F2, F1G2, $G1(1E)_F$/F2, and $F1(1ENter)_G$/F2. *In N. clevelandii*, the accumulation range was 37 ± 13 to 69 ± 23 μg g^{-1} in symptomatic plants compared with 35 ± 8 to 50 ± 24 μg g^{-1} in asymptomatic plants. Data analyses with Student's *t*-test indicated no statistically significant correlation between virus titre and symptom expression ($P=0.3913$ for *N. benthamiana* and $P=0.1204$ for *N. clevelandii*). These results were corroborated by Northern blotting using riboprobes specific to RNA1 and RNA2 (data not shown).

DISCUSSION

In this study, the 3′ end of the GFLV-GHu $1E^{Pol}$ coding region was identified as a symptom determinant in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* by using a reverse genetics approach with infectious clones of two GFLV strains that exhibit a differential phenotype. To our knowledge, this is the first report on a viral gene determinant of symptom expression for a member of the genus *Nepovirus*, family *Secoviridae*. To date, the symptom determinants identified for secovirids are proteins involved in replication and polyprotein maturation such as type III helicase, 3C-like cysteine proteinase (Fan *et al.*, 2011; Gu & Ghabrial, 2005) and type I polymerase (this study).

The GFLV-GHu RdRp segment involved in symptomatology in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* is located between residues 689 and 824, which are downstream of the canonical polymerase domains (residues 22–526) (Chisholm *et al.*, 2007). This situation is similar to some potex- and cucumoviruses. For example, a single amino acid at the RdRp C terminus, located away from the polymerase domain of potato virus X (PVX), determines symptoms in *Nicotiana* spp. (Kagiwada *et al.*, 2005). For *Plantago asiatica* mosaic virus, a single RdRp C-terminal residue is responsible for the phenotype on *N. benthamiana* with Cys^{1154} inducing necrosis and Tyr^{1154} an asymptomatic infection (Ozeki *et al.*, 2006). In the case of GFLV, the RdRp segment (408 nt and 136 aa) involved in symptom determinism is extremely variable among GFLV strains with only 62–77 % and 60–74 % nucleotide and amino acids identities, respectively. To further narrow the segment eliciting symptoms, short stretches of 45 residues were exchanged between GFLV-GHu and -F13 at the $1E^{Pol}$ C terminus. Unfortunately, transcripts thereof failed to induce systemic infection in the presence of functional RNA2 transcripts (data not shown).

No proteolytic cleavage of GFLV protein $1E^{Pol}$ was documented in transient expression assays and in infected plants by Western blot analyses, in spite of a putative cleavage site (G^{704}/E^{705}) that could theoretically release a C-terminal $1E^{Pol}$ peptide of 13.2 kDa in the region involved in symptom determinism. Because a 92 kDa protein corresponding to a mature $1E^{Pol}$ was always detected, regardless of the assay and experimental conditions, a functional protein

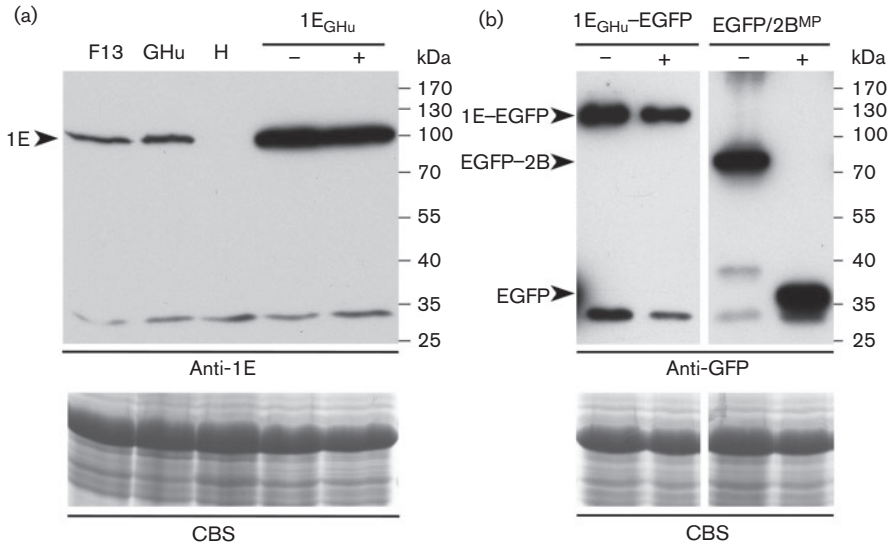


Fig. 4. Western blot analysis of GFLV protein 1E^{Pol} accumulation in *N. benthamiana* infected with GFLV-F13 or -GHu at 7 days p.i. and in *N. benthamiana* agroinfiltrated with a native or an EGFP-fused GFLV-GHu protein 1E^{Pol} co-expressed with tomato bushy stunt virus P19 in the presence (+) or absence (–) of GFLV proteinase 1D^{Pro} at 3 days p.i. Proteins were separated by SDS-PAGE and analysed by Western blotting using an anti-1E^{Pol} serum (a) or anti-GFP mAbs (b). The EGFP/2B^{MP} construct was used to verify GFLV 1D^{Pro} activity. Arrowheads indicate expected protein sizes. H, healthy plant; CBS, Coomassie blue-stained proteins.

1E^{Pol} in GFLV-infected *N. benthamiana* does not seem to be truncated, unlike that of ToRSV (Chisholm *et al.*, 2007).

GFLV symptom expression in *N. benthamiana* and *N. clevelandii* is not correlated with a higher virus titre. This neutral association between virus accumulation and symptom expression is also known for brome mosaic virus (Rao & Grantham, 1995), PVX (Kagiwada *et al.*, 2005) grapevine virus A (Haviv *et al.*, 2012) and tobacco mosaic virus (Mansilla *et al.*, 2009). In contrast, a positive correlation between virus titre and symptom expression was shown for bean pod mottle virus (Gu & Ghabrial, 2005) and CMV (Du *et al.*, 2008; Kim & Palukaitis, 1997).

Several viral pathogenicity determinants are VSRs (Wang *et al.*, 2012). For example, CMV 2b induces disease symptoms by interfering with microRNA-regulated turnover of host mRNAs (Lewsey *et al.*, 2007) and HC-Pro targets the miR167 that regulates the AUXIN RESPONSE FACTOR 8 in *Arabidopsis thaliana* (Jay *et al.*, 2011). Remarkably, many VSR genes are overprinted on either the N-terminal (P69 and P0) or C-terminal (2b of CMV and 2B of flock house virus) region of viral RdRp genes. The unique coupling of RNA replication and VSR functions can create gene modules for evolution and adaptation (Li & Ding, 2006). The GFLV-GHu 1E^{Pol} is a symptom determinant with no apparent potent VSR activity, as shown by three independent procedures, although we cannot exclude a weak VSR activity, as reported for the CP of another member of the family *Secoviridae* (Cañizares *et al.*, 2004), or a tissue-specific VSR activity such as for p31 of beet necrotic yellow vein virus (Rahim *et al.*, 2007).

Viral symptom determinants are mostly proteins; however, nucleotide sequences can also affect symptom expression (Hirata *et al.*, 2003; Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991; Wang & Simon, 2000). For example, a single silent mutation located downstream of the polymerase domain at the 3′ end of the RdRp gene of apple stem grooving virus is responsible for symptom attenuation (Hirata *et al.*, 2003). Also, three stem–loops in the 5′UTR of RNA2 of GCMV, a subgroup B nepovirus, induce severe necrotic symptoms in several *Nicotiana* spp. when expressed from a PVX vector but do not act as dominant symptom determinants (Fernandez *et al.*, 1999). The possible effect of the stem–loops in the 5′UTR of GFLV-GHu RNA2 (Vigne *et al.*, 2008) in symptom expression was ruled out in this study upon analysis of RNA1 and RNA2 assortants (Fig. 2). More work is needed to determine whether amino acids or nucleotide stretches are responsible for GFLV-GHu symptoms on *N. benthamiana* and *N. clevelandii*. We hypothesize that the mechanism(s) of symptom induction by the GFLV-GHu 1E^{Pol} coding region, the central role of protein 1E^{Pol} in virus replication and hitherto undiscovered functions associated with protein 1E^{Pol} might involve multiple interactions with host cellular factors. A better characterization of the functional domains on the GFLV 1E^{Pol} coding region and elucidation of symptom determinism in a wider array of hosts, including in grapevine, the natural host, are likely to be necessary to elucidate the mechanism of symptom expression.

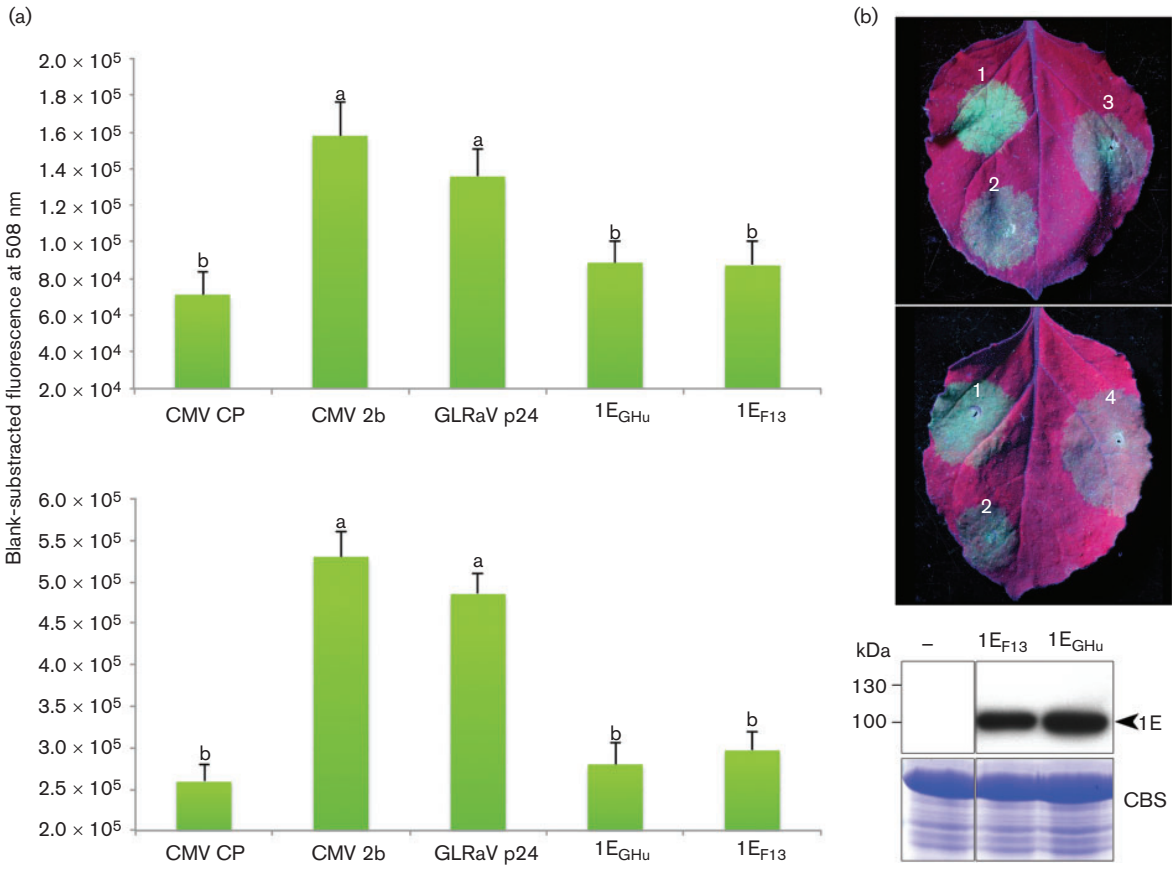


Fig. 5. (a) Fluorescence output in agroinfiltrated areas of EGFP-expressing transgenic *N. benthamiana* infiltrated with GFLV-1E$_{GHu}$, GFLV-1E$_{F13}$ and controls (CMV CP, CMV 2b and GLRaV-2 p24). Elevated fluorescence following either co-infiltration with TRV–EGFP and subsequently with individual pGA482G-derived constructs (n=8; upper panel), or infiltration with individual pGA482G-derived constructs (n=9; lower panel) is shown. The same letter within a graph represents no significant difference in fluorescence (P<0.05) in ANOVA using Fisher's least significant difference post-hoc test. Error bars represent SE. (b) WT *N. benthamiana* plants co-agroinfiltrated with pBinGFP and pBin2b (1), pBinGFP and an empty pBin (2), pBinGFP and pMDC32-1E$_{F13}$ (3) or pBinGFP and pMDC32-1E$_{GHu}$ (4), photographed under UV light at 5 days p.i. (upper two panels). Accumulation of GFLV protein 1E^{Pol} was determined by Western blot analysis of total proteins extracted from agroinoculated patches 2 (–), 3 (1E$_{F13}$) and 4 (1E$_{GHu}$) using an anti-GFLV protein 1E^{Pol} serum (lower panel). CBS, Coomassie blue-stained proteins.

METHODS

Virus strains and viral cDNA clones. GFLV-F13 (Ritzenthaler *et al.*, 1991; Serghini *et al.*, 1990) and -GHu (Vigne *et al.*, 2008) were isolated from naturally infected grapevines and propagated in *C. quinoa*, a systemic host. Full-length cDNA clones of GFLV-F13 RNA1 and RNA2 were used for *in vitro* synthesis of infectious transcripts (Viry *et al.*, 1993).

The full-length cDNA of GFLV-GHu RNA1 was amplified by IC-RT-PCR using primers GH1f and GH1r (Table S3) and crude extracts from infected *C. quinoa* leaves (Vigne *et al.*, 2004). All RT-PCRs and PCRs were carried out using the Phusion RT-PCR (Finnzymes) or High Fidelity PCR (Roche Applied Science). To obtain pG1, the PCR amplicon was cloned into *Sal*I/*Xma*I-digested pUC18 (Fig. 1). The full-length RNA2 of GFLV-GHu in plasmid pG2 was obtained by RT-PCR in a three cloning steps approach (Fig. 1) using total RNA extracted from infected *C. quinoa* leaves with an RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), and appropriate primers (Table S3, Fig. 1).

Development of chimaeric GFLV-F13 and -GHu RNA1. Plasmids pF1 and pG1 were used as templates to develop chimaeric cDNAs of GFLV RNA1 by exchanging cDNA parts of strains F13 and GHu. For cloning purposes, a *Sna*BI restriction site was introduced first into both plasmids (Fig. 3) by site-directed mutagenesis with overlap PCR extension (Ho *et al.*, 1989) using primer pairs G40/G43 and G42/G44 (Table S3). The corresponding products were mixed and amplified by PCR with primer pair G40/G42, yielding a 5799 nt fragment that was cloned in the corresponding plasmid after *Xho*I/*Not*I digestion (Fig. 3). The same strategy was used to engineer plasmids with a complete or fragmented chimaeric 1E^{Pol} coding region [pF1(1E)$_G$, pG1(1E)$_F$, pF1(1ENter)$_G$ and pF1(1ECter)$_G$] (Table S4, Fig. 3). Plasmids pF1(5′1AB)$_G$, pG1(5′1AB)$_F$, pF1(1BCD)$_G$ and pF1(1E3′)$_G$ were obtained by cloning DNA fragments digested with appropriate restriction enzymes (Fig. 3).

***In vitro* transcription of GFLV cDNA clones and mechanical inoculation of plants.** Transcripts of WT, mutated and chimaeric

GFLV-F13 and -GHu RNA1 and WT GFLV RNA2 were obtained from corresponding cDNAs by *in vitro* transcription with an mMESSAGE mMACHINE T7 kit (Ambion) after linearization with appropriate restriction enzymes (Fig. 1). *C. quinoa* and *N. benthamiana* plants were inoculated mechanically with transcripts of GFLV RNA1 and RNA2 or combinations thereof (Viry *et al.*, 1993). Symptoms were monitored at 6–14 days p.i. and systemic infection was assessed in uninoculated apical leaves at 2 weeks p.i. by DAS-ELISA (Vigne *et al.*, 2004). Tissue from infected *C. quinoa* was used as inoculum for symptom monitoring experiments on *N. benthamiana* and *N. clevelandii*.

Characterization of GFLV-GHu RNA1, GFLV progeny and infectious clones by sequencing. The complete nucleotide sequence of GFLV-GHu RNA1 was determined from overlapping cDNA fragments obtained by IC-RT-PCR using specific primers (Table S4). The 5′- and 3′-terminal sequences were obtained by 5′/3′RACE (Roche Applied Science). The complete nucleotide sequence GHu RNA1 (GenBank accession no. JN391442) was used to design primers GH1f and GH1r (Table S3).

The progeny of chimaeric viruses F1(1E)$_G$ and F1(1ECter)$_G$ was determined by IC-RT-PCR and sequencing of a region encompassing the 3′ end of the 1D^{Pro} coding region, the complete 1E^{Pol} coding region and the 5′ part of the 3′UTR. The assays used crude extracts of apical leaves and oligo(dT) for the RT step, and primer pairs G9/G10, G11/G12, G13/G14 and G15/16 for the PCR steps (Table S4).

All the cDNAs and plasmids were fully sequenced to verify integrity (Table S4). Nucleotide sequences were analysed using the Vector NTI software (Informax).

Analysis of GFLV accumulation by semi-quantitative DAS-ELISA. GFLV detection by DAS-ELISA was performed using specific serological reagents (Bioreba). Samples were ground in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at a 1 : 10 ratio (w/v). Leaf extracts were further diluted 100-fold and DAS-ELISA absorbance values were compared with known amounts of purified GFLV serially diluted in sap of healthy plants. Semi-quantitative DAS-ELISA data were compiled, and statistical analyses were used to determine significant relationships between virus accumulation and symptom expression using Student's *t*-test and ANOVA analyses with a program written in R (Ihaka & Gentleman, 1996).

Transient expression of GFLV proteins in plants. Plasmids pMDC32-1E$_{F13}$ and pMDC32-1E$_{GHu}$ were obtained by PCR amplification using pF1 and pG1 as templates and primers 146/148 and 107/108, respectively (Table S5), to add an *attB1* sequence and an ATG at the 5′ end, and an *attB2* sequence at the 3′ end of the 1E^{Pol} coding region. Amplicons were introduced by Gateway® cloning into the pDONR/Zeo vector (Invitrogen) to produce pDZ-1E$_{F13}$ and pDZ-1E$_{GHu}$, which were further recombined into the destination vectors pMDC32 (Curtis & Grossniklaus, 2003). To produce plasmid pK7-1E$_{GHu}$–EGFP, PCR was carried out using pG1 and primers 108/109 to remove the stop codon before sequential recombinations into plasmids pDonRZeo and pK7FWG2. All plasmids were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 pMP90 and used for agroinfiltration in the presence of tomato bushy stunt virus protein P19.

The GFLV-F13 1D^{Pro} coding region flanked by *attB1* and ATG sequences at the 5′ end, and *attB2* and TAA sequences at the 3′ end was PCR amplified from pF1 using primers 191/189 (Table S5), and subsequently recombined into pDONR/Zeo and pMDC32 vectors. The resulting plasmid, pMDC32-1D^{Pro}, was used for expression of GFLV-F13 proteinase 1D^{Pro}. The control pK7EGFP/2B^{MP} clone allowed synthesis of a chimaeric protein encompassing the complete EGFP, the last 9 aa of GFLV-F13 protein 2A^{HP} with a functional C/A cleavage site, and the GFLV-F13 protein 2B^{MP}.

Protein extraction and Western blot analysis. Total *N. benthamiana* proteins were extracted from agroinfiltrated leaf patches (3–5 days p.i.) or infected leaves (10–14 days p.i.) in PBS (pH 7.4) in the presence of protease inhibitors (Complete; Roche) in a Precellys tissue grinder (Bertin Technologies). Proteins (20 µl) were resolved by SDS-PAGE (10 % acrylamide) and electrotransferred onto Immobilon PVDF membranes. Specific GFLV 1E^{Pol} rabbit antibodies (Eurogentec) raised against peptide HVPSKTSFMKVPDELC corresponding to conserved aa 29-–4 of GFLV-GHu and -F13 protein 1E^{Pol} were used in Western blot analysis at a 1 : 2000 dilution. Goat anti-rabbit–HRP (1 : 12 500) and a Lumi-Light chemiluminescence system (Roche) were used for antigen detection. The anti-GFP mAb (diluted 1 : 1000) was from Clontech.

VSR assays. The GFLV-GHu (1E$_{GHu}$) and -F13 (1E$_{F13}$) 1E^{Pol} coding region was amplified by PCR from pG1 and pF1, respectively. CMV 2b (Choi *et al.*, 2008) and GLRaV-2 p24 (Chiba *et al.*, 2006) were used as VSR controls, and the CP gene of CMV (Namba *et al.*, 1991) was used as a negative control. GLRaV-2 p24 was obtained by one-step RT-PCR using appropriate primers and total RNA of infected *Vitis vinifera* cv. Chaouch rose.

Digested DNA products were subcloned into the plant expression vector pEPT8$_{BB}$ or pEPT8$_{MCS2}$ modified from Ling *et al.* (1997) to contain *Bgl*II and *Bcl*I restriction sites flanking a double CaMV 35S promoter, or to contain *Not*I within the CaMV 35S cassette, respectively. Individual virus coding regions within the CaMV 35S cassette (Table S5) were then restriction digested and ligated into the binary vector pGA482G (Pang *et al.*, 2000). The full-length EGFP (a derivative of S65T GFP; Clontech) coding sequence was cloned into TRV RNA2 (pTRV2) (Ratcliff *et al.*, 2001) to produce pTRV2-EGFP. Binary vectors were mobilized into *A. tumefaciens* strains C58Z707 (EGFP, 1E$_{F13}$, 1E$_{GHu}$, CMV CP and p24) or GV3101 (CMV 2b and pTRV2-EGFP) via electroporation. Plasmids pBinGFP, pBin2b and an empty pBin were also used in co-infiltration experiments on WT *N. benthamiana* plants.

N. benthamiana expressing EGFP were obtained by *A. tumefaciens*-mediated transformation using strain C58Z707 containing pGA482G-EGFP. Regenerated plants were self-pollinated through T$_5$. High and homogeneous levels of EGFP expression were confirmed by confocal microscopy and quantitative fluorescence measurements in transgenic line 12 (T12) through each generation (data not shown). Leaves of T12 plants were agroinfiltrated with constructs containing genes of known VSRs, various controls and 1E^{Pol} of GFLV-F13 or -GHu. For the experiments using a TRV-derived EGFP construct, 13 days elapsed between TRV infiltration and individual gene infiltration. Subsequently, 5 days elapsed between infiltration of individual virus coding regions and sample collection. Samples (2 cm^2) were collected from each agroinfiltrated leaf, ground in phosphate buffer (pH 7.5) using a TissueLyser (Qiagen), and 100 µl homogenates were added to three wells per sample in a 96-well microplate. Fluorescence was measured using a Synergy2 microplate reader (BioTek) set for excitation at 484 nm and emission at 508 nm. Technical replicates were averaged together to produce a sample output. Sample output measurements were compared in SAS (SAS Institute) by ANOVA, and significant differences ($P<0.05$) were assigned using Fisher's least significant difference post-hoc test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr J. Mutterrer for Figure J software (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:utilities:figurej:start), Dr J. Oliver for helpful discussions, Drs S. Saito and E. Duchêne for statistical

analyses, Dr S. Gray for EGFP and CMV 2b constructs, Dr D. C. Baulcombe for pBinGFP and pBin2b, Dr G. B. Martin for pTRV1 and pTRV2, and P. Marsella Herrick, H. Gutting, P. Tristram, E. Cieniewicz and C. Y. Mei for technical assistance. This work was supported by INRA, a fellowship from the Department Santé des Plantes et Environnement of INRA to E. V., Hatch Act Formula and Nolan Funds to M. F., an extension assistantship from the College of Agriculture and Life Science, Cornell University to J. G., and a USDA-NIFA pre-doctoral fellowship to J. G. This work is dedicated to the memory of Drs Lothaire Pinck and Valérie Goldschmidt.

REFERENCES

Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P. & Fuchs, M. (2004a). *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *J Plant Pathol* **86**, 183–195.

Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V. & Fuchs, M. (2004b). The specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* **320**, 12–22.

Cañizares, M. C., Taylor, K. M. & Lomonossoff, G. P. (2004). Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of Cowpea mosaic virus are required for suppression of silencing. *J Gen Virol* **85**, 3431–3435.

Chiba, M., Reed, J. C., Prokhnevsky, A. I., Chapman, E. J., Mawassi, M., Koonin, E. V., Carrington, J. C. & Dolja, V. V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**, 7–14.

Chisholm, J., Zhang, G., Wang, A. & Sanfaçon, H. (2007). Peripheral association of a polyprotein precursor form of the RNA-dependent RNA polymerase of *Tomato ringspot virus* with the membrane-bound viral replication complex. *Virology* **368**, 133–144.

Choi, M. S., Yoon, I.-S., Rhee, Y., Choi, S. K., Lim, S.-H., Won, S. Y., Lee, Y. H., Choi, H. S., Lee, S. C. & other authors (2008). The effect of Cucumber mosaic virus 2b proteinto transient expression and transgene silencing mediated by agro-infiltration. *Plant Pathol* **24**, 296–304.

Culver, J. N. & Padmanabhan, M. S. (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 221–243.

Curtis, M. D. & Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiol* **133**, 462–469.

Díaz-Pendón, J. A. & Ding, S.-W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 303–326.

Du, Z., Chen, F., Zhao, Z., Liao, Q., Palukaitis, P. & Chen, J. (2008). The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of cucumber mosaic virus subgroup I strains both play a role in viral RNA accumulation and induction of symptoms. *Virology* **380**, 363–370.

Dunoyer, P. & Voinnet, O. (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 415–423.

Fan, Q., Niroula, M., Feldstein, P. A. & Bruening, G. (2011). Participation of the *Cowpea mosaic virus* protease in eliciting extreme resistance. *Virology* **417**, 71–78.

Fernandez, I., Candresse, T., Le Gall, O. & Dunez, J. (1999). The 5′ noncoding region of grapevine chrome mosaic nepovirus RNA-2 triggers a necrotic response on three *Nicotiana* spp. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 337–344.

Gu, H. & Ghabrial, S. A. (2005). The *Bean pod mottle virus* proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. *Virology* **333**, 271–283.

Harrison, B. D. & Murant, A. F. (1977). Nematode transmissibility of pseudorecombinant isolates of tomato black ring virus. *Ann Appl Biol* **86**, 209–212.

Harrison, B. D., Murant, A. F., Mayo, M. A. & Roberts, I. M. (1974). Distribution of determinants for symptom production, host range and nematode transmissibility between the two RNA components of raspberry ringspot virus. *J Gen Virol* **22**, 233–247.

Haviv, S., Iddan, Y., Goszczynski, D. & Mawassi, M. (2012). The ORF5 of Grapevine virus A is involved in symptoms expression in *Nicotiana benthamiana* plants. *Ann Appl Biol* **160**, 181–190.

Heaton, L. A., Lee, T. C., Wei, N. & Morris, T. J. (1991). Point mutations in the turnip crinkle virus capsid protein affect the symptoms expressed by *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **183**, 143–150.

Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2003). A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. *J Gen Virol* **84**, 2579–2583.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.

Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996). R: A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Statist* **5**, 299–314.

Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J.-P. & Voinnet, O. (2011). Misregulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR 8* underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *PLoS Pathog* **7**, e1002035.

Jovel, J., Walker, M. & Sanfaçon, H. (2007). Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *J Virol* **81**, 12285–12297.

Jovel, J., Walker, M. & Sanfaçon, H. (2011). Salicylic acid-dependent restriction of *Tomato ringspot virus* spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 706–718.

Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J* **11**, 479–488.

Kagiwada, S., Yamaji, Y., Komatsu, K., Takahashi, S., Mori, T., Hirata, H., Suzuki, M., Ugaki, M. & Namba, S. (2005). A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the *Potato virus X* genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Res* **110**, 177–182.

Kim, C.-H. & Palukaitis, P. (1997). The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J* **16**, 4060–4068.

Lamprecht, R. L., Maree, H. J., Stephan, D. & Burger, J. T. (2012). Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Virus Genes* **45**, 406–410.

Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* **40** (Database issue), D302–D305.

Lewsey, M., Robertson, F. C., Canto, T., Palukaitis, P. & Carr, J. P. (2007). Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J* **50**, 240–252.

Lewsey, M., Surette, M., Robertson, F. C., Ziebell, H., Choi, S. H., Ryu, K. H., Canto, T., Palukaitis, P., Payne, T. & other authors (2009). The

role of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 642–654.

Li, F. & Ding, S.-W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* **60**, 503–531.

Ling, K. S., Zhu, H. Y., Alvizo, H., Hu, J. S., Drong, R. F., Slightom, J. L. & Gonsalves, D. (1997). The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Arch Virol* **142**, 1101–1116.

Mansilla, C., Sánchez, F., Padgett, H. S., Pogue, G. P. & Ponz, F. (2009). Chimeras between *Oilseed rape mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* highlight the relevant role of the tobamoviral *RdRp* as pathogenicity determinant in several hosts. *Mol Plant Pathol* **10**, 59–68.

Martin, D. P., Williamson, C. & Posada, D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**, 260–262.

Mekuria, T. A., Gutha, L. R., Martin, R. R. & Naidu, R. A. (2009). Genome diversity and intra- and interspecies recombination events in *Grapevine fanleaf virus*. *Phytopathology* **99**, 1394–1402.

Oliver, J. E., Vigne, E. & Fuchs, M. (2010). Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* populations. *Virus Res* **152**, 30–40.

Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamashita, K., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M. & Namba, S. (2006). A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. *Arch Virol* **151**, 2067–2075.

Padmanabhan, M. S., Goregaoker, S. P., Golem, S., Shiferaw, H. & Culver, J. N. (2005). Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J Virol* **79**, 2549–2558.

Pang, S.-Z., Jan, F.-J., Tricoli, D. M., Russell, P. F., Carney, K. J., Hu, J. S., Fuchs, M., Quemada, H. D. & Gonsalves, D. (2000). Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Mol Breed* **6**, 87–93.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**, 6815–6824.

Rahim, M. D., Andika, I. B., Han, C., Kondo, H. & Tamada, T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J Gen Virol* **88**, 1611–1619.

Rao, A. L. & Grantham, G. L. (1995). A spontaneous mutation in the movement protein gene of brome mosaic virus modulates symptom phenotype in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* **69**, 2689–2691.

Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558–1560.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. & Baulcombe, D. C. (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* **25**, 237–245.

Ritzenthaler, C., Viry, M., Pinck, M., Margis, R., Fuchs, M. & Pinck, L. (1991). Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *J Gen Virol* **72**, 2357–2365.

Rodríguez-Cerezo, E., Klein, P. G. & Shaw, J. G. (1991). A determinant of disease symptom severity is located in the 3′-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9863–9867.

Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R. & Wetzel, T. (2009). *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Arch Virol* **154**, 899–907.

Schellenberger, P., Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Bergdoll, M., Marmonier, A., Vigne, E., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G. & Ritzenthaler, C. (2010). A stretch of 11 amino acids in the βB-βC loop of the coat protein of *Grapevine fanleaf virus* is essential for transmission by the nematode *Xiphinema* index. *J Virol* **84**, 7924–7933.

Scholthof, H. B., Scholthof, K. B. & Jackson, A. O. (1995). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* **7**, 1157–1172.

Serghini, M. A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. & Pinck, L. (1990). RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J Gen Virol* **71**, 1433–1441.

Shiboleth, Y. M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S. A., Gaba, V. & Gal-On, A. (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* **81**, 13135–13148.

Shigetou, N., Kaishu, L., Gonsalves, C., Gonsalves, D. & Slightom, J. L. (1991). Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Gene* **107**, 181–188.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & Fuchs, M. (2004). Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J Gen Virol* **85**, 2435–2445.

Vigne, E., Marmonier, A. & Fuchs, M. (2008). Multiple interspecies recombination events within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus*. *Arch Virol* **153**, 1771–1776.

Viry, M., Serghini, M. A., Hans, F., Ritzenthaler, C., Pinck, M. & Pinck, L. (1993). Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *J Gen Virol* **74**, 169–174.

Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206–220.

Wang, J. & Simon, A. E. (2000). 3′-End stem–loops of the subviral RNAs associated with turnip crinkle virus are involved in symptom modulation and coat protein binding. *J Virol* **74**, 6528–6537.

Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N. A. & Shimura, H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 1275–1285.

Whitham, S. A. & Wang, Y. (2004). Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 365–371.

Wingard, S. A. (1928). Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J Agric Res* **37**, 127–153.

Zhu, S., Gao, F., Cao, X., Chen, M., Ye, G., Wei, C. & Li, Y. (2005). The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases *in vivo*, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiol* **139**, 1935–1945.

Grapevine fanleaf virus capsid protein is compatible with the simultaneous exposure of proteins to virus-like particles inner and outer surfaces

Lorène Belval[1,2], Caroline Hemmer[1,2] Claude Sauter[3], Catherine Reinbold[1], Jean-Daniel Fauny[3], François Berthold[2], Léa Ackerer[124], Corinne Schmitt-Keichinger[2], Olivier Lemaire[1], Gérard Demangeat[1*] and Christophe Ritzenthaler[2*]

Author affiliations

[1] INRA, UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, associée à l'Université de Strasbourg, 68021 Colmar, France.

[2] Institut de Biologie Moléculaire des Plantes CNRS-UPR 2357, associée à l'Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France.

[3] Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France.

[4]Institut français de la vigne et du vin, Domaine de l'Espiguette. 30240 Le Grau du Roi, France.

*Corresponding authors. E-mail: ritzenth@unistra.fr (C.R.) and gerard.demangeat@colmar.inra.fr (G.D.)

Summary

Virus-like particles (VLPs) derived from non-enveloped viruses result from the self-assembly of multiple copies of capsid proteins (CPs). They generally display similar structural features to viral particles but are non-infectious and their inner cavity and outer surface can be adapted to serve as nanocarriers of great biotechnological interest. While VLP outer surface is generally easily amenable to chemical or genetic modifications, encaging of cargo within particles can be more complex and is often limited to small molecules or peptides. Examples where both inner cavity and outer surface have been used to simultaneously encapsulate and expose entire proteins remain scarce. Here we describe the production of VLPs simultaneously exposing fluorescent proteins at their outer surface and inner cavity as a result of the self-assembly of a single genetically modified viral structural protein, the CP of grapevine fanleaf virus (GFLV). We found that the N- and C-terminal ends of the GFLV CP are compatible with the genetic fusion of proteins as large as 27 kDa and the plant-based production of nucleic-acid free VLPs. Remarkably, pending N- or C-terminal fusion, up to sixty recombinant proteins can be exposed to either the inner cavity or outer surface of VLPs, respectively. Such properties are rather unique for a single viral structural protein and open new potential avenues for the design of safe, effective and versatile nanocarriers, particularly for the targeted delivery of bioactive molecules.

Introduction

From a structural and biotechnological standpoint, virions can be viewed as self-assembled nanometer-sized cages or viral nanoparticles (VNPs) containing the viral genome. Genetic engineering has allowed the development of nucleic acid-free VNPs also named virus-like particles or VLPs that can be regarded as a subclass of VNPs. VNPs-based nanomaterials have been adapted essentially through chemical reactions or genetic engineering to gain new functionalities. First, their external surfaces can be modified or decorated with other molecules, in which case, VNPs can act as biocompatible nanocarriers for antigen presentation, immunomodulation, customized targeting, *etc,* as exemplified by the plant-infecting cowpea mosaic virus (CPMV) (Chatterji et al., 2004; Lewis et al.,

2006; Sainsbury et al., 2010; Steinmetz et al., 2011), tobacco mosaic virus (TMV) (Alonso et al., 2013) or cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) (Suci et al., 2007). Second, as self-assembled cages, the inner cavity of VNPs can be used to encapsulate or encage a variety of active molecules, including pharmaceuticals, image enhancers or nucleic acids (Arcangeli et al., 2014; Bruckman et al., 2013; Mueller et al., 2011; Shriver et al., 2013). By acting on both external surface and inner cavity, VNPs can be adapted theoretically at will and are therefore regarded as extremely versatile tools with great potentials in medicine, as enzyme nano-carriers or even as novel biomaterials (for review see (Alonso et al., 2013; Cardinale et al., 2012; Pokorski and Steinmetz, 2010).

Despite their interesting traits, the possibilities offered by VNPs are often limited due to numerous constraints. For instance, whether derived from attenuated or killed animal viruses, bacteriophages or plant viruses, VNPs may contain a viral genome and are therefore considered as hazardous infectious entities. In this respect, VLPs are highly advantageous over viral VNPs, because they are non-infectious and a multitude of viral structural proteins have been adapted to this end (for review see (Chen and Lai, 2013; Liu et al., 2012). However, the direct production of VLPs is strictly limited to viruses for which the viral genome is dispensable for particle assembly, a property shared mostly by icosahedral viruses but rarely by rod-shaped ones. Probably the best know exception is provided by TMV whose coat protein (CP) has been modified to allow the assembly of stable rod-shaped VLPs when expressed in bacteria and in absence of the viral genome (Brown et al., 2013). However, due to the narrow space offered by their hollow inner channel, 4 nm in the case of TMV, rod-shaped viruses remain limited in their encapsulation capacity.

In general, while external surface of VLPs can easily accommodate modifications, the encapsulation capacity of VLPs is often restricted to only small molecules such as ions, nucleic acids, pharmaceuticals or small peptides (for review see (Glasgow and Tullman-Ercek, 2014; Li and Wang, 2014; Saunders and Lomonossoff, 2013). To date, relatively few examples of encapsulation of foreign cargo proteins have been reported and are limited to VLPs derived from viruses with spherical architecture including the bacteriophages Qß (Fiedler et al., 2010; Rhee et al., 2011) and P22 (Patterson et al., 2013), the simian virus 40 (SV40) (Inoue et al., 2008) the hepatitis B virus (HBV) (Lee and Tan, 2008), the enveloped avian leucosis sarcoma virus (ALSV) (Kaczmarczyk et al., 2011)

and the plant-infecting CCMV (Minten et al., 2009; Rurup et al., 2014). In all these cases, encapsulation involves at least two separate protein components or nucleic acid linkers and is rather restrictive in number of encapsulated proteins. To our knowledge, VLP made from a single structural protein compatible with the simultaneous inner and outer exposure of entire proteins via genetic fusions has not been described.

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the main causal agent of fanleaf degeneration, probably the most detrimental viral diseases on the socially emblematic crop grapevine. GFLV is closely related to animal picornaviruses and belongs to the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae* (Sanfaçon et al., 2009). GFLV is a non-enveloped icosahedral virus of 30 nm in diameter, comprising 60 identical CP subunits of 56 kDa, arranged in a *pseudo T = 3* symmetry which structure has been resolved at 2.7 Å resolution (Schellenberger et al., 2011b). Pseudo-particles have been observed in transgenic plants expressing GFLV CP coding sequence suggesting that the CP of GFLV is able to self-assemble into VLPs (Barbier et al., 1997). Here we show that the CP of GFLV is a highly potent nanoblock for biotechnological applications, compatible with the simultaneous encapsulation and exposure of large proteins through specific genetic fusions to the N- or C-terminal end of the CP.

Results

GFLV coat protein self-assembles into virus-like particles

To address the ability of GFLV CP to produce VLPs *in planta,* the sequence encoding the CP from GFLV isolate F13 was introduced in the pEAQ-*HT*-DEST1 binary vector (Sainsbury *et al.*, 2009) (Figure 1) and used for transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves upon agro-infiltration. Samples were analyzed by direct double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) at 7 days post agro-infiltration (dpi) using as positive control *N. benthamiana* leaves from GFLV-F13 infected plants at 14 days post-inoculation (dpi), and as negative controls pEAQ-*HT*-DEST1-driven TagRFP (TR, Merzlyak *et al.*, 2007) agro-infiltrated leaves at 7 dpi and leaves from healthy plants. A strong positive signal was detected in CP-infiltrated and GFLV-infected samples but not in extracts from TR-infiltrated or healthy leaf material (Figure 2a), confirming the expression of CP upon agro-infiltration. To test the ability of transiently expressed CP to self-assemble into VLPs, the same leaf extracts were

further analyzed by transmission electron microscopy (TEM) after immunocapture with GFLV-specific polyclonal antibodies (see methods). Observation of negatively-stained material (Figure 2b) revealed the presence of icosahedral particles of about 30 nm in diameter in CP-expressing samples but not in TR-expressing or healthy negative controls (Figure 2b). Although not very dense on grids, CP-derived icosahedral particles were very similar to GFLV particles observed under equivalent conditions (Figure 2b). This indicates that GFLV CP is able to self-assemble into VLPs upon transient expression in *N. benthamiana*.

GFLV CP maintains its capacity to assemble into VLPs upon fusion of its N- or C-terminal end to foreign proteins

Analysis of the GFLV atomic structure (Schellenberger et al., 2011b) reveals that the GFLV CP amino-terminal residue Gly_1 and the three carboxy-terminal residues Phe_{502}, Pro_{503} and Val_{504} do not contribute to the quaternary interactions of the virus capsid and are exposed to the inner and outer surface of the GFLV particle, respectively (Figure 3a and 3b). In this respect, both extremities are expected to be compatible with the addition of extra-residues without interfering with the capacity of the CP to form a capsid. To test this hypothesis, N- or C-terminal CP fusions to TR were produced and named TRCP and CPTR hereafter (Figure 1). Both fusions included a Gly_3-Ser-Gly_3 as linker peptide (Figure 1 and S1) to maintain flexibility between the CP and TR domains (Zilian and Maiss, 2011; Reddy Chichili *et al.*, 2013) and were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves. Five days post agro-infiltration, samples were controlled by epifluorescence macroscopy for TR expression (Figure S2), and two days later analyzed by DAS-ELISA for CP expression (Figure 3c) and by TEM for content in VLPs (Figure 3d). While TR fluorescence was observed in all samples (Figure S2) suggesting proper expression of the different proteins, CP was detected only in CPTR and TRCP crude extracts by DAS-ELISA (Figure 3c), which correlated with the presence of VLPs in TEM (Figure 3d). These results suggest that GFLV CP retains its capacity to form VLPs upon fusion of its N- or C-terminal end to TR.

To confirm our results and to gain insights into the biochemical properties of VLPs, large-scale production in *N. benthamiana* leaves was carried out followed by purification using standard GFLV

purification procedure in the absence of protease inhibitors (see methods). In parallel, GFLV was purified from infected *C. quinoa* leaves. After linear sucrose gradient, a pink band was observed in the TRCP gradient (Figure S3a). Two mL sucrose gradient fractions were collected and those enriched in VLPs identified by semi-quantitative DAS-ELISA. While *bona fide* GFLV particles sedimented towards the bottom of the gradient in fractions 8-10, CP-, CPTR- and TRCP-derived particles located to the lighter fractions 3-5, 4-6 and 6-8, respectively (Figure S3b), well is in agreement with previous report indicating that empty GFLV particles display lower density than RNA-containing virions (Quacquarelli *et al.*, 1976). Enriched fractions were further pooled and processed for final concentration by ultracentrifugation. Remarkably, pink pellets were observed in both TRCP and CPTR samples (Figure 4a). The final concentration of purified material (Figure 4b) was determined by quantitative DAS-ELISA using purified GFLV as a standard. Determined yields ranged from 386 to 445 µg GFLV-particles equivalent per kg of fresh leaves for the three VLP types, which is in the same order of magnitude than GFLV purification yields from infected *N. benthamiana* (Schellenberger et al., 2011a).

To assess their quality and purity, purified samples were analyzed by Coomassie blue staining after SDS-PAGE (Figure 4c), immunoblotting using anti-GFLV or anti-TR antibodies (Figure 4d and 4e) and mass spectrometry (Figure S4). For Coomassie blue staining, six µg of GFLV equivalent of each sample were loaded on SDS-denaturing gel. In line with the purification of VLPs, one major protein of about 57 kDa co-migrating with the CP of GFLV (calculated mass 56 kDa) was present in purified samples from CP-expressing leaves (Figure 4c, bands 1 and 2). For CPTR and TRCP samples, profiles were more complex with three major proteins of approximate molecular mass 87, 73 and 57 kDa being detected (Figure 4c, bands 3-5 for CPTR and 6-8 for TRCP) but in inverse proportions. For TRCP the larger product was the most abundant and the smaller the least abundant (approximately 69 %, 24 % and 7 % respective abundance), whereas for CPTR the proportions were as follow: 2 %, 35 % and 63 %. Upon immunoblotting with anti-GFLV antibodies, the shorter product present in the CPTR sample (Figure 4c, band 5) was clearly detected (Figure 4d), strongly suggesting that band 5 corresponds to the CP of GFLV and probably represents a processing product of CPTR. In the TRCP sample, the larger product (Figure 4c, band 6) immunoreacted clearly with anti-GFLV antibodies (Figure 4d).

Considering this band is about the expected size of TRCP (calculated mass 82.8 kDa), our results suggest that the full-length TRCP is the principal protein present in the purified TRCP sample. Accordingly, band 6 gave also a strong signal upon immunodetection with anti-TR antibodies (Figure 4e). Anti-TR antibodies immunoreacted also but weakly with the larger product present in the CPTR sample (band 3) and with the 73 kDa truncated products observed in CPTR and TRCP samples (Figure 4e, bands 4 and 7). Our results suggest that TRCP and CPTR have the capacity to self- assemble into VLPs *in planta*. The also reveal clear differences in the capacity of these VLP to accommodate fusion proteins with TRCP-derived VLP being far less prone to degradation or truncation than CPTR-derived one.

To gain further insights into the composition of the purified products, Coomassie-stained bands were subjected to mass spectrometry leading to the identification of peptides covering nearly the entire CP for each band analysed (Figure 4c and Figure S4). Peptides corresponding to TR were only observed for bands 3, 4, 6 and 7 and nearly full coverage of the CPTR or TRCP proteins strictly restricted to bands 3 and 6. The 73 kDa products corresponding to band 4 and 7 displayed only partial coverage of the TR and thus represent a truncated version of CPTR or TRCP, possibly due to proteolytic degradation during the purification process and the absence of protease inhibitors. Our results demonstrate that the CPTR or TRCP full-length chimeric proteins can be purified following standard virus purification procedures likely reflecting their capacity to self-assembly into VLPs. They also reveal that the CPTR fusion is more labile than the TRCP,one, possibly as a consequence of the predicted different orientation of TR towards the internal or external surface of VLPs.

N- and C-terminal CP fusions are oriented towards the interior and exterior of VLPs, respectively.

To confirm the presence of VLPs and the different orientation displayed by TR in CPTR and TRCP samples, negative staining and immunosorbent electron microscopy (ISEM) analyses were performed. As expected, negative staining revealed the presence of numerous VLPs in all samples (Figure 5d, 5g and 5j) that clearly resembled GFLV particles (Figure 5a). Under these conditions, CP and CPTR particles appeared electron-dense (Figure 5d and 5g) similarly to RNA-containing GFLV particles

188 (Figure 5a) whereas TRCP particles appeared electron-lucent (Figure 5j), likely reflecting the
189 increased inner density of particles and decreased penetrability to heavy metals linked to the
190 orientation of TR towards the interior of VLPs. To verify the topology of VLPs, decoration assays
191 were performed with anti-GFLV (Figure 5b, 5e, 5h and 5k) or anti-TR antibodies (Figure 5c, 5f, 5i
192 and 5l). While all purified particles reacted to anti-GFLV antibodies as expected (Figure 5b, 5e, 5h
193 and 5k), only CPTR particles were decorated with anti-TR antibodies (Figure 5i), in spite of the
194 significantly greater proportion of full-length protein present in TRCP versus CPTR particles (Figure
195 4). The observed differences in accessibility to TR antibodies confirms the orientation of TR towards
196 the outer surface in CPTR-derived VLPs and the encaging of TR inside the particles in TRCP-derived
197 VLPs. Perhaps most importantly, our results also clearly show that GFLV CP can accommodate the
198 fusion of foreign proteins as large as fluorescent proteins (FP) that represent approximately half the
199 mass of the CP without loss in its capacity to self-assemble into VLPs.

200 ## Hybrid VLPs can be produced

201 In view of our results, we next examined the capacity of GFLV CP to form hybrid VLPs upon co-
202 expression of N- and C-terminal CP fusions. To do so, EGFP was fused to the CP N-terminus as
203 indicated in Figure 1 (construct CPEG). As before, agro-infiltrated *N. benthamiana* leaves were used
204 for expression assays and purification of VLPs. CPEG expressing leaves were used as negative control
205 and compared to leaves coexpressing CPEG and TRCP (CPEG + TRCP). In compliance with our
206 previous results, CPEG VLPs could be purified and located to the same linear sucrose gradient
207 fractions than CPTR VLPs (Figure S3b). Coexpressed CPEG and TRCP also enabled the purification
208 of DAS-ELISA immunoreactive material cosedimenting with CPEG VLPs (Figure S3b). ISEM
209 analysis confirmed the presence of VLPs in both CPEG and CPEG + TRCP samples that clearly
210 immunoreacted with both anti-GFLV and anti-EGFP antibodies (Figure 6), well in agreement with the
211 predicted exposure of EGFP towards the external surface of VLPs. Considering TR is inaccessible to
212 antibodies in ISEM upon fusion to the CP N-terminus, we further assessed the presence of EGFP and
213 TR by fluorescence imaging of VLPs separated by native agarose gel electrophoresis (Figure 7).
214 Under such conditions, distinct bands with specific migration profiles were detected for TRCP VLPs

(Figure 7a), CPEG VLPs (Figure 7b) and CPEG + TRCP VLPs (Figure 7a and b) that emitted in both green and red channels as expected for hybrid particles (Figure 7a and 7b).

To confirm the production of *bona fide* hybrid VLPs and hence the presence of particles that emit simultaneously in green and red and should therefore appear yellow, purified samples were further processed for single particle microscopy. In this manner, TRCP VLPs appeared as numerous individual red spots (Figure 7c). Similarly, distinct green spots likely corresponding to CPEG VLPs were also detected but in lower density (Figure 7d), likely reflecting the low abundance of full-length protein in purified CPEG VLPs samples. Importantly, the observation of a mix of separately purified CPEG and TRCP VLPs revealed individual red- or green-only VLPs (Figure 7e). In contrast, yellow spots likely corresponding to hybrid VLPs were detected only in CPEG + TRCP-derived samples (Figure 7f). Altogether, our results demonstrate that GFLV CP is fully compatible with the production of hybrid VLPs in which foreign proteins as large as FP can be simultaneously exposed to the outer surface and encaged in the inner lumen of individual VLPs upon N- or C-terminal fusion to the CP.

GFLV CP is compatible with the stoichiometric 1:1 encapsidation and exposure of FP in VLPs

To estimate the maximum number of FP that could be incorporated in VLPs upon genetic fusion to the CP, we modeled CPEG- and TRCP-derived particles (see method). Both fusions turned out to be fully compatible with the formation of VLP (Figure 8). According to our models, CPEG that includes the gateway-derived linker peptide, leads to the formation of VLPs with apparent diameter of 48.5Å in which the FP is evenly distributed and floating at the particle outer surface (Figure 8a). In contrast, TRCP results in the formation of VLP with a diameter of 29.0Å identical to those of virions, but in which the FP forms a tightly packed layer in the inner cavity of the particles (Figure 8b). We also modeled TRCPEG, a theoretical CP (1000 residues) in which both termini are fused to FP (Figure 8c) revealing that, at least *in silico*, GFLV CP is compatible with the simultaneous encapsidation and exposure of FP, representing altogether 120 FP per VLP. The calculated mass of such TRCPEG VLP (6.69 MDa) is nearly twice that of CP-only VLPs (3.37 MDa).

GFLV CP derived VLPs are nucleic acid-free

To examine the composition of VLPs, native agarose gel electrophoresis was performed and gel stained with Coomassie blue or ethidium bromide for protein (Figure 9a) or nucleic acids content (Figure 9b). Upon protein staining, the migration profiles of CP, CPTR and TRCP VLPs as well as purified GFLV differed significantly, probably as a consequence of differences in net charge, density and mass of the various particles. Under UV illumination a clear signal was observed with purified virus but not with CP-derived VLPs (Figure 9a). We attributed the faint bands observed with CPTR and TRCP VLPs (Figure 9b, arrowheads) to the slight TR excitation under UV light (Merzlyak *et al.*, 2007) and the use of filters unable to fully discriminate TR and nucleic acid spectra rather than to the presence of nucleic acids. Upon spectrophotometer analysis, only purified virus led to high $A_{260/280}$ values (>1.6) indicative of the presence of nucleic acids, whereas those measured for the different VLPs ranged from 0.89 to 1.07 (Figure 9c). Our results suggest that VLPs are within the limits of our detection methods, nucleic acid-free.

Discussion

We have shown that, GFLV CP when expressed transiently in plants is able to form VLPs that can be purified using standard *Nepovirus* purification procedures. Such VLPs look similar to native GFLV particles and appear nucleic acid-free. Altogether, our results indicate that GFLV CP has the capacity to self-assemble into VLPs in an RNA-independent manner as already suggested from the presence of empty GFLV particles in samples from infected plants (Quacquarelli et al., 1976) and upon ectopic expression of CP in transgenic plants (Barbier et al., 1997). This capacity is probably a general feature of *Nepovirus*-encoded CPs considering empty particles are commonly seen or upon ectopic expression of nepoviral CPs in transgenic plants or insect cells (Barbier et al., 1997; Bertioli et al., 1991; Seitsonen et al., 2008; Singh et al., 1995) or upon virus purification (Lai-Kee-Him et al., 2013). Most remarkable is the ability of GFLV CP to maintain its capacity to self-assemble into VLPs upon genetic fusion to proteins as large as FP that represent about half the size of the CP (256 residues including linker sequence vs 504 for CP).

While CPs of numerous viruses accommodate genetic fusions and retain their ability to self-assemble into VLPs, these are commonly restricted to peptides as exemplified with SV40 (Takahashi et al., 2008), bacteriophage P22 (Servid et al., 2013) or CCMV (Brumfield et al., 2004; Hassani-Mehraban et al., 2015) rather than full-length proteins. Another common limitation observed with VLPs is linked to sites of insertion of foreign proteins not necessarily located at the extremities but often exposed within loops of the CP, as it is the case for HBV (Kratz et al., 1999; Peyret et al., 2015) or CPMV (Porta et al., 2003), requiring the inserted proteins to be fused to both extremities. From this viewpoint, GFLV CP appears rather special among the realm of VLP-compatible CPs from animal, bacterial and plant viruses.

Certainly the most remarkable about our findings is the differential orientation of the foreign proteins upon fusion to the N- or C-terminal end of GFLV CP, resulting in either encaging or exposure of FP to the particle outer surface, respectively. While exposure of proteins of interest to the VLPs outer surface is commonly achieved, encaging of proteins is less frequent and currently only demonstrated for some icosahedral viruses (for review see (Sainsbury et al., 2014)). To our best knowledge, identification of a single CP having simultaneously the capacity to (i) self-assemble into nucleic-acid free VLPs, (ii) accommodate N- and C-terminal genetic fusions, and (iii) expose and encage large recombinant proteins is unique and highlights the versatility of the CP of GFLV as a nanocarrier. Despite the low primary sequence conservation among CP from nepovirus (Sanfaçon et al., 2009), it is likely that the unique properties established here for the CP of GLFV extend to most if not all CPs from the genus *Nepovirus*. Hence, the reported atomic structures of tobacco ringspot virus (Chandrasekar and Johnson, 1998), blackcurrent reversion virus (Seitsonen et al., 2008) and the backbone model of arabis mosaic virus (Lai-Kee-Him et al., 2013) all show N-terminal ends facing the interior of the particle and C-terminal residues exposed at the capsid outer surface.

Modeling of VLPs reveals that GFLV CP is structurally compatible with the outer-surface exposure and encaging of 60 FP molecules per VLP (Figure 8). This seems in contradiction with our experimental data, in particular those concerning proteins exposed at the outer-surface of VLPs that represent only a minor proportion in purified particles (Figure 4). The CP of *Tomato black ring virus* (TBRV), was shown to undergo proteolytic processing resulting in the loss of the 9 C-terminal amino

296 acids (Demangeat et al., 1992). Although the CP of GFLV doesn't seem to undergo similar processing
297 (Schellenberger et al., 2011b), addition of residues may promote the cleavage of additional C-terminal
298 amino acids. Flexibility provided by the linker peptide may also contribute to increased fragility of the
299 exposed recombinant proteins and its truncation. Probably the most likely explanations reside in the
300 suboptimal transient expression system used and the purification procedure performed in the absence
301 of protease inhibitors. This could clearly also account for the discrepancy in the proportion of full-
302 length recombinant proteins present in purified VLPs (Figure 4) since FPs encaged into VLPs are
303 likely to be less prone to proteolysis than those exposed at the outer surface. Future progress will aim
304 at optimizing the VLP production system to approach the theoretical features deduced from our
305 structural modeling. This includes reducing proteins truncation, improving VLPs purification yields
306 and ensuring that a GFLV CP with both ends fused to foreign proteins as modeled in Figure 8c still
307 forms VLPs. In the optimal scenario, this could lead to the purification of VLPs harboring up to 120 (2
308 x 60) copies of given foreign proteins as the result of the expression of a single recombinant protein,
309 opening novel biotechnological applications such as targeted delivery of functional proteins.
310 Finally, GFLV CP-derived VLPs may also provide new perspectives to explore fundamental
311 mechanisms such as tubule-guided movement in plants (Amari et al., 2010; Ritzenthaler and
312 Hofmann, 2007) and virus transmission from plant to plant by nematode vectors (Marmonier et al.,
313 2010; Schellenberger et al., 2010). Indeed, the effective production of VLPs *in planta* in which FPs are
314 encaged, should prove to be a unique and powerful tool to track particles during infection by
315 fluorescence microscopy approaches, in particular, during intracellular and cell-cell movement of
316 virus through plasmodesmata and also during the nematode feeding process.
317

Experimental procedures

Construction of binary plasmids

Coding sequences for GFLV-F13 CP, TagRFP and EGFP were amplified by PCR using Phusion high fidelity DNA polymerase according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific) using pVec$_{Acc65I}$2ABC (Schellenberger et al., 2010), pTagRFP-C (Evrogen) and pEGFP-N1 (Clontech) as templates, respectively. The translational fusions TRCP and CPTR, corresponding respectively to N- or C-terminal fusions of GFLV-CP$_{F13}$ with TagRFP, were obtained by overlapping PCRs (Ho *et al.*, 1989) using above described PCR products as templates and overlapping primers encoding the Gly$_3$-Ser-Gly$_3$ peptide linker sequence. The *att*B-flancked CP, TR, CPTR and TRCP PCR products were cloned by Gateway recombination into the pDONR/Zeo entry vector (Invitrogen) and further recombined into the pEAQ-*HT*-DEST1 binary plasmid (Sainsbury et al., 2009). For CPEG, in which the C-terminus of the CP is fused to EGFP, a pDONR/Zeo entry vector containing the CP coding sequence devoid of stop codon was used for cloning by recombination in a homemade Gateway expression vector deriving from the pEAQ-*HT*-DEST1 (Sainsbury et al., 2009) vector by the introduction of the EGFP encoding sequence downstream of the *att*R2 recombination site. Recombination resulted in the introduction of the DPAFLYKVVRSFGPA linker peptide between CP C-terminal residue and EGFP (Figure 1 and S1). All the primers used for cloning are available upon request.

Plant material, virus infection and VLP production

C. quinoa and *N. benthamiana* plants were grown in greenhouses at 22 / 18 °C (day / night). GFLV infectious crude sap derived from pMV13 + pVec$_{Acc65I}$2ABC-infected material (Schellenberger et al., 2010) was used to mechanically inoculate three weeks old *C. quinoa*. Plants were harvested 14 days post-inoculation and used for virus purification. For mechanical inoculations of *N. benthamiana,* three weeks old plants were inoculated with purified GFLV at 300 ng per plant. VLPs were produced by transient expression via agro-infiltration of *N. benthamiana* leaves. Binary plasmids were introduced by electroporation and maintained in *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101(pMP90). Cultures were grown to stable phase in Luria-Bertani media with appropriate antibiotics, pelleted and

resuspended in sterile water, alone or in a 1:1 ratio for coexpression, to a final absorbance of 0.5 at 600 nm. Suspensions were infiltrated into four weeks old *N. benthamiana* leaves with 2 ml plastic syringes. Healthy, infected and agro-infiltrated *N. benthamiana* plants were maintained in a growth chamber set at 14 h light / 10 h dark photoperiod (4800 lx) with a temperature setting of 21 / 18°C (day / night) for 7 days before leaf harvesting.

Agro-infiltrated-leaves observation

FP visualization was realized 5 days post-agro-infiltration. Leaves were imaged with an AxioZoom V16 macroscope (Zeiss, Germany) using 450-490 nm / 500-550 nm excitation / emission wavelength filters for EGFP and of 538-562 nm / 570-640 nm for TagRFP visualization. Images were processed using ImageJ (Schneider et al., 2012) and GNU Image Manipulation Program (GIMP, www.gimp.org).

DAS-ELISA

Healthy, infected and agro-infiltrated leaves were ground at 1:5 w/v ratio in HEPES 100 mM pH8 and saps clarified for 5 min at 3000 *g*. GFLV or VLPs detection was performed using a commercial DAS-ELISA kit (Bioreba) according to the manufacturer's instructions. Briefly, plates were coated with polyclonal anti-GFLV antibodies diluted in coating buffer at 1:1000 dilution, incubated with clarified extracts before addition of anti-GFLV monoclonal antibodies coupled to alkaline phosphatase at 1:1000 dilution in conjugate buffer. Three washings were done between each step of the DAS-ELISA procedure. Detection was realized using *para*-nitrophenylphosphate and absorbance at 405 nm measured with a Titertek Multiskan MCC/340 reader (Labsystems). Samples were considered positive when the absorbance values exceeded the control samples by at least a factor of three.

Negative staining, immunocapture and immunosorbent electron microscopy

Healthy, infected and agro-infiltrated leaves were ground in HEPES 100 mM pH 8, sap clarified by centrifugation at 3000 *g* for 5 min and processed for negative staining, immunocapture or ISEM. Negative staining was performed on 300 mesh nickel grids covered with carbon-coated Formvar (Electron Microscopy Science) by incubation for 90 sec with a 1 % ammonium molybdate solution. For immunocapture, grids were coated with polyclonal anti-GFLV antibodies (Bioreba) at 1:100

372 dilution, incubated with plant saps for 2 h at 4°C, washed in HEPES 25 mM pH 8 buffer and finally
373 processed for negative staining. For ISEM, grids were coated with monoclonal antibodies against
374 GFLV at 0.05 mg/mL and incubated with VLPs for 1 h at room temperature. After blocking with 2 %
375 w/v BSA, 10 % v/v normal goat serum, 0.05 % Triton-X100 in 22.5 mM HEPES pH 8, grids were
376 further incubated with either anti-GFLV (Bioreba) at 1:100 dilution or anti-TR polyclonal antibodies
377 at 0.01 mg/mL (Evrogen) for 1 h at room temperature. Immunogold labeling was performed using
378 anti-rabbit antibodies conjugated to 10 nm colloidal gold particles at 1:50 dilution (British Biocell
379 International). Washes with HEPES 25 mM pH 8 were done between all steps. ISEM were performed
380 in a similar manner except that anti-GFLV polyclonal antibodies (Bioreba) were used for capture and
381 either a mix of anti-GFLV monoclonal antibodies (Gaire et al., 1999) or anti-EG monoclonal
382 antibodies (Roche) employed for detection. Finally, immunogold labeling was performed using anti-
383 mouse antibodies conjugated with 10 nm colloidal gold particles (British Biocell International).
384 Observations were realized using a Philips EM208 transmission electron microscope. Film-based
385 photographs were acquired onto Kodak Electron Image Films SO-163 (Electron Microscopy Science)
386 and developed. Micrographs were scanned and images processed using GNU Image Manipulation
387 Program (GIMP, www.gimp.org).

388 ## GFLV-CP structure representation and analysis

389 CP subunit and capsid representations were made using the previously 3 Å resolved GFLV-F13
390 atomic structure (PDB ID: 4V5T, (Schellenberger et al., 2011b)) using the UCSF Chimera package
391 (Pettersen et al., 2004). The CP subunit ends accessibility data were obtained using VIPERdb
392 (Carrillo-Tripp et al., 2009).

393 ## Virus and VLP purification

394 GFLV was purified from *C. quinoa* infected-plants according to Schellenberger et al., (2011a). VLPs
395 were purified from agro-infiltrated *N. benthamiana* leaves following the same experimental procedure,
396 except that the final discontinuous sucrose gradient was omitted. Briefly, a minimum of 350 g of
397 leaves were ground in extraction buffer, the resulting extract was filtered, incubated with bentonite and
398 finally clarified by centrifugation for 15 min at 1900 *g*. VLPs were precipitated from clarified sap by

399 adding PEG-20,000 and sodium chloride and further processed by centrifugation on a sucrose cushion
400 followed by a sucrose density gradient fractionation. Two ml fractions were collected from which
401 aliquots at 1:500, 1:5,000 and 1:10,000 dilutions were processed for a semi-quantitative DAS-ELISA
402 to identify VLP-enriched fractions that were further pooled before final ultracentrifugation at
403 290,000 *g* for 2 hours. After resuspension in HEPES 25 mM pH8, VLPs were quantified by a DAS-
404 ELISA (Vigne et al., 2013) using purified GFLV as a standard.

405 ## SDS-PAGE, western-blot and mass spectrometry

406 For SDS-PAGE analysis, 6 µg of GFLV-particles equivalent from each purified sample were
407 separated on an 8 % acrylamide gel and stained with Coomassie blue using Instant Blue (Expedeon).
408 For mass spectrometry, SDS-PAGE bands of interest were excised and proteins destained, reduced,
409 alkyled, trypsin-digested overnight, chemotrypsin-digested and finally processed for nanoLC-MSMS
410 analysis on a nanoU3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific)-ESI-MicroTOFQII (Bruker). Mass
411 spectrometry data were analyzed with the help of Mascot (Matrix Science Limited) and Proteinscape
412 (Bruker). For Western-blot analyses, 0.05 µg of each sample were resolved on an 8 % acrylamide gel
413 and denatured proteins electro-transferred onto Immobilon PVDF membranes. Membranes were
414 incubated with rabbit polyclonal anti-GFLV antibodies at a 1:1000 dilution or with commercial
415 polyclonal anti-TR antibodies (Evrogen) at a 1:5000 dilution. Proteins were revealed by
416 chemiluminescence after incubation with goat anti-rabbit conjugated to horseradish peroxydase at a
417 1:12,500 dilution (Thermo Fisher Scientific) and Lumi-Light solution (Roche). Images were taken
418 with a G:Box imaging system (Syngene), analyzed with GeneTools (Syngene) and finally processed
419 with GIMP (www.gimp.org).

420 ## Single-particle epifluorescence microscopy

421 Purified VLPs were diluted in HEPES 25 mM pH 8 in order to obtain individual spots upon imaging
422 on an inverted epi-fluorescence microscope Axio Observer Z1 (Zeiss) equipped with an Orca Flash4.0
423 camera (Hamamatsu, Japan) and Spectra X light engine (Lumencor). Excitation and emission
424 wavelength filters were 455-495 nm and 505-555 nm for EGFP and of 532.5-557.5 nm and 570-640
425 nm for TagRFP. Images were processed as described above.

Native agarose gel electrophoresis

Native gel electrophoresis of purified virions and VLPs was performed in 1 % w/v agarose gels in 0.5X TAE buffer (20 mM TrisBase, 1.3 mM EDTA, 0.06 % v/v acetic acid). For nucleic-acids detection, 5 µg of virus particles or VLPs were diluted in loading buffer (10 % v/v glycerol, HEPES 25 mM pH 8) supplemented with ethidium bromide (EtBr) at 0.1 µg/mL. After electrophoretic separation, the EtBr-prestained gel was first processed for nucleic-acid content using the Gel Doc system (Bio-Rad) equipped with a 302 nm excitation source and a 520-640 nm band-pass emission filter before processing for Coomassie blue staining as mentioned previously.

For fluorescence imaging, 3 µg of purified VLPs were diluted in loading buffer and native gel electrophoresis performed in the absence of EtBr. Imaging was done with a G:Box imaging system (Syngene) equipped with a 450-485 nm excitation LED module and a 510-540 nm emission band-pass filter for EGFP visualization. TR visualization was realized upon 480-540 nm LED excitation and 590-660 nm band-pass emission filtering.

Modeling

The crystal structures of GFLV (PDBid 4V5T), GFP (PDBid 1GFL) and RFP (PDBid 3M22) were used to model the CPEG, TRCP or TRCPEG VLPs. Chimeric CPs were created with Modeller (Eswar et al., 2006) by appending the linker and corresponding FP sequences to the free C- and N-terminal ends of the CP pointing outside and inside the VLP, respectively. Full capsids were reconstituted using the icosahedral symmetry in PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC). The position of the FP in the TRCP capsid was adjusted to avoid steric clashes using Coot (Emsley et al., 2010).

Acknowledgements

We thank Philippe Choquet for critical reading of the manuscript. The authors are grateful to the proteomic platform staff of the University of Strasbourg for mass spectrometry analyses and to the gardenes of the Experimental Unit at INRA Colmar. LB was supported by a contrat doctoral from the University of Strasbourg. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), the Université de Strasbourg and the Conseils Interprofessionels des vins d'Alsace, Champagne, Bourgogne and Bordeaux.

References

Alonso, J., Górzny, M. and Bittner, A. (2013) The physics of tobacco mosaic virus and virus-based devices in biotechnology. *Trends in biotechnology* **31**, 530-538.

Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C.L. and Heinlein, M. (2010) A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**, e1001119-e1001119.

Arcangeli, C., Circelli, P., Donini, M., Aljabali, A.A., Benvenuto, E., Lomonossoff, G.P. and Marusic, C. (2014) Structure-based design and experimental engineering of a plant virus nanoparticle for the presentation of immunogenic epitopes and as a drug carrier. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **32**, 630-647.

Barbier, P., Demangeat, G., Perrin, M., Cobanov, P., Jacquet, C. and Walter, B. (1997) Grapevine genetically transformed with the coat protein gene of grapevine fanleaf virus: an analysis of transformants. In: *Extended Abstracts of the 12th ICVG Meeting, Lisbon (P)* p. 131.

Bertioli, D., Harris, R., Edwards, M., Cooper, J. and Hawes, W. (1991) Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J. Gen. Virol* **72**, 1801-1809.

Brown, A.D., Naves, L., Wang, X., Ghodssi, R. and Culver, J.N. (2013) Carboxylate-directed in vivo assembly of virus-like nanorods and tubes for the display of functional peptides and residues. *Biomacromolecules* **14**, 3123-3129.

Bruckman, M.A., Hern, S., Jiang, K., Flask, C.A., Yu, X. and Steinmetz, N.F. (2013) Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 1482-1490.

Brumfield, S., Willits, D., Tang, L., Johnson, J.E., Douglas, T. and Young, M. (2004) Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *Journal of general virology* **85**, 1049-1053.

Cardinale, D., Carette, N. and Michon, T. (2012) Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends in biotechnology* **30**, 369-376.

Carrillo-Tripp, M., Shepherd, C.M., Borelli, I.A., Venkataraman, S., Lander, G., Natarajan, P., Johnson, J.E., Brooks, C.L. and Reddy, V.S. (2009) VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic acids research* **37**, D436-D442.

Chandrasekar, V. and Johnson, J.E. (1998) The structure of tobacco ringspot virus: a link in the evolution of icosahedral capsids in the picornavirus superfamily. *Structure* **6**, 157-171.

Chatterji, A., Ochoa, W., Shamieh, L., Salakian, S.P., Wong, S.M., Clinton, G., Ghosh, P., Lin, T. and Johnson, J.E. (2004) Chemical conjugation of heterologous proteins on the surface of cowpea mosaic virus. *Bioconjugate chemistry* **15**, 807-813.

Chen, Q. and Lai, H. (2013) Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics* **9**, 26-49.

Demangeat, G., Hemmer, O., Reinbolt, J., Mayo, M. and Fritsch, C. (1992) Virus-specific proteins in cells infected with tomato black ring nepovirus: evidence for proteolytic processing in vivo. *Journal of general virology* **73**, 1609-1614.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 486-501.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M.y., Pieper, U. and Sali, A. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics*, 5.6. 1-5.6. 30.

Fiedler, J.D., Brown, S.D., Lau, J.L. and Finn, M. (2010) RNA-Directed Packaging of Enzymes within Virus-like Particles. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 9648-9651.

Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. and Ritzenthaler, C. (1999) Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**, 25-36.

Glasgow, J. and Tullman-Ercek, D. (2014) Production and applications of engineered viral capsids. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 5847-5858.

Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., van Heereveld, L. and Kormelink, R. (2015) Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC biotechnology* **15**, 80.

Inoue, T., Kawano, M.-a., Takahashi, R.-u., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Imai, T., Kataoka, K. and Handa, H. (2008) Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *Journal of biotechnology* **134**, 181-192.

Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Young, H.A., Hughes, S.H. and Chatterjee, D.K. (2011) Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 16998-17003.

Kratz, P.A., Böttcher, B. and Nassal, M. (1999) Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 1915-1920.

Lai-Kee-Him, J., Schellenberger, P., Dumas, C., Richard, E., Trapani, S., Komar, V., Demangeat, G., Ritzenthaler, C. and Bron, P. (2013) The backbone model of the Arabis mosaic virus reveals new insights into functional domains of Nepovirus capsid. *Journal of structural biology* **182**, 1-9.

Lee, K.W. and Tan, W.S. (2008) Recombinant hepatitis B virus core particles: association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein. *Journal of virological methods* **151**, 172-180.

Lewis, J.D., Destito, G., Zijlstra, A., Gonzalez, M.J., Quigley, J.P., Manchester, M. and Stuhlmann, H. (2006) Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nature medicine* **12**, 354-360.

Li, F. and Wang, Q. (2014) Fabrication of Nanoarchitectures Templated by Virus-Based Nanoparticles: Strategies and Applications. *Small* **10**, 230-245.

Liu, Z., Qiao, J., Niu, Z. and Wang, Q. (2012) Natural supramolecular building blocks: from virus coat proteins to viral nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **41**, 6178-6194.

Marmonier, A., Schellenberger, P., Esmenjaud, D., Schmitt-Keichinger, C., Ritzenthaler, C., Andret-Link, P., Lemaire, O., Fuchs, M. and Demangeat, G. (2010) The coat protein determines the specificity of virus transmission by Xiphinema diversicaudatum. *Journal of Plant Pathology*, 275-279.

Minten, I.J., Hendriks, L.J., Nolte, R.J. and Cornelissen, J.J. (2009) Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 17771-17773.

Mueller, A., Eber, F.J., Azucena, C., Petershans, A., Bittner, A.M., Gliemann, H., Jeske, H. and Wege, C. (2011) Inducible site-selective bottom-up assembly of virus-derived nanotube arrays on RNA-equipped wafers. *ACS nano* **5**, 4512-4520.

Patterson, D.P., Schwarz, B., Waters, R.S., Gedeon, T. and Douglas, T. (2013) Encapsulation of an enzyme cascade within the bacteriophage P22 virus-like particle. *ACS chemical biology* **9**, 359-365.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **25**, 1605-1612.

Peyret, H., Gehin, A., Thuenemann, E.C., Blond, D., El Turabi, A., Beales, L., Clarke, D., Gilbert, R.J., Fry, E.E. and Stuart, D.I. (2015) Tandem Fusion of Hepatitis B Core Antigen Allows Assembly of Virus-Like Particles in Bacteria and Plants with Enhanced Capacity to Accommodate Foreign Proteins. *PloS one* **10**.

Pokorski, J.K. and Steinmetz, N.F. (2010) The art of engineering viral nanoparticles. *Molecular pharmaceutics* **8**, 29-43.

559 Porta, C., Spall, V.E., Findlay, K.C., Gergerich, R.C., Farrance, C.E. and Lomonossoff, G.P. (2003)
560 Cowpea mosaic virus-based chimaeras: effects of inserted peptides on the phenotype, host
561 range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* **310**, 50-63.
562 Quacquarelli, A., Gallitelli, D., Savino, V. and Martelli, G. (1976) Properties of grapevine fanleaf virus.
563 *Journal of General Virology* **32**, 349-360.
564 Rhee, J.-K., Hovlid, M., Fiedler, J.D., Brown, S.D., Manzenrieder, F., Kitagishi, H., Nycholat, C., Paulson,
565 J.C. and Finn, M. (2011) Colorful virus-like particles: fluorescent protein packaging by the Qβ
566 capsid. *Biomacromolecules* **12**, 3977-3981.
567 Ritzenthaler, C. and Hofmann, C. (2007) Tubule-guided movement of plant viruses. In: *Viral transport*
568 *in plants* pp. 63-83. Springer.
569 Rurup, W.F., Verbij, F., Koay, M.S., Blum, C., Subramaniam, V. and Cornelissen, J.J. (2014) Predicting
570 the loading of virus-like particles with fluorescent proteins. *Biomacromolecules* **15**, 558-563.
571 Sainsbury, F., Cañizares, M.C. and Lomonossoff, G.P. (2010) Cowpea mosaic virus: the plant virus-
572 based biotechnology workhorse. *Annual review of Phytopathology* **48**, 437-455.
573 Sainsbury, F., Saxena, P., Aljabali, A.A., Saunders, K., Evans, D.J. and Lomonossoff, G.P. (2014) Genetic
574 engineering and characterization of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles. *Methods*
575 *Mol Biol* **1108**, 139-153.
576 Sainsbury, F., Thuenemann, E.C. and Lomonossoff, G.P. (2009) pEAQ: versatile expression vectors for
577 easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant biotechnology*
578 *journal* **7**, 682-693.
579 Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., Van der Vlugt, R. and Wetzel, T. (2009) Secoviridae: a
580 proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families
581 Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the
582 proposed genus Torradovirus. *Archives of virology* **154**, 899-907.
583 Saunders, K. and Lomonossoff, G.P. (2013) Exploiting plant virus-derived components to achieve in
584 planta expression and for templates for synthetic biology applications. *New Phytologist* **200**,
585 16-26.
586 Schellenberger, P., Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Bergdoll, M., Marmonier, A., Vigne, E.,
587 Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G. and Ritzenthaler, C. (2010) A stretch of 11 amino acids
588 in the βB-βC loop of the coat protein of Grapevine fanleaf virus is essential for transmission
589 by the nematode Xiphinema index. *Journal of virology* **84**, 7924-7933.
590 Schellenberger, P., Demangeat, G., Lemaire, O., Ritzenthaler, C., Bergdoll, M., Oliéric, V., Sauter, C.
591 and Lorber, B. (2011a) Strategies for the crystallization of viruses: Using phase diagrams and
592 gels to produce 3D crystals of Grapevine fanleaf virus. *Journal of Structural Biology* **174**, 344-
593 351.
594 Schellenberger, P., Sauter, C., Lorber, B., Bron, P., Trapani, S., Bergdoll, M., Marmonier, A., Schmitt-
595 Keichinger, C., Lemaire, O., Demangeat, G. and Ritzenthaler, C. (2011b) Structural Insights
596 into viral determinants of nematode mediated Grapevine fanleaf virus transmission. *PLoS*
597 *Pathog* **7**, e1002034.
598 Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image
599 analysis. *Nature methods* **9**, 671-675.
600 Seitsonen, J.J., Susi, P., Lemmetty, A. and Butcher, S.J. (2008) Structure of the mite-transmitted
601 Blackcurrant reversion nepovirus using electron cryo-microscopy. *Virology* **378**, 162-168.
602 Servid, A., Jordan, P., O'Neil, A., Prevelige, P. and Douglas, T. (2013) Location of the Bacteriophage
603 P22 Coat Protein C-Terminus Provides Opportunities for the Design of Capsid-Based
604 Materials. *Biomacromolecules* **14**, 2989-2995.
605 Shriver, L.P., Plummer, E.M., Thomas, D.M., Ho, S. and Manchester, M. (2013) Localization of
606 gadolinium-loaded CPMV to sites of inflammation during central nervous system
607 autoimmunity. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 5256-5263.
608 Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B.V. and Buckley, B. (1995) Expression of tobacco ringspot virus
609 capsid protein and satellite RNA in insect cells and three-dimensional structure of tobacco
610 ringspot virus-like particles. *Virology* **213**, 472-481.

611 Steinmetz, N.F., Ablack, A.L., Hickey, J.L., Ablack, J., Manocha, B., Mymryk, J.S., Luyt, L.G. and Lewis,
612 J.D. (2011) Intravital Imaging of Human Prostate Cancer Using Viral Nanoparticles Targeted to
613 Gastrin-Releasing Peptide Receptors. *Small* **7**, 1664-1672.
614 Suci, P.A., Varpness, Z., Gillitzer, E., Douglas, T. and Young, M. (2007) Targeting and photodynamic
615 killing of a microbial pathogen using protein cage architectures functionalized with a
616 photosensitizer. *Langmuir* **23**, 12280-12286.
617 Takahashi, R.-u., Kanesashi, S.-n., Inoue, T., Enomoto, T., Kawano, M.-a., Tsukamoto, H., Takeshita, F.,
618 Imai, T., Ochiya, T. and Kataoka, K. (2008) Presentation of functional foreign peptides on the
619 surface of SV40 virus-like particles. *Journal of biotechnology* **135**, 385-392.
620 Vigne, E., Gottula, J., Schmitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., Rakotomalala, L.,
621 Lemaire, O., Ritzenthaler, C. and Fuchs, M. (2013) A strain-specific segment of the RNA-
622 dependent RNA polymerase of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in Nicotiana
623 species. *Journal of General Virology* **94**, 2803-2813.

624

625

Figures

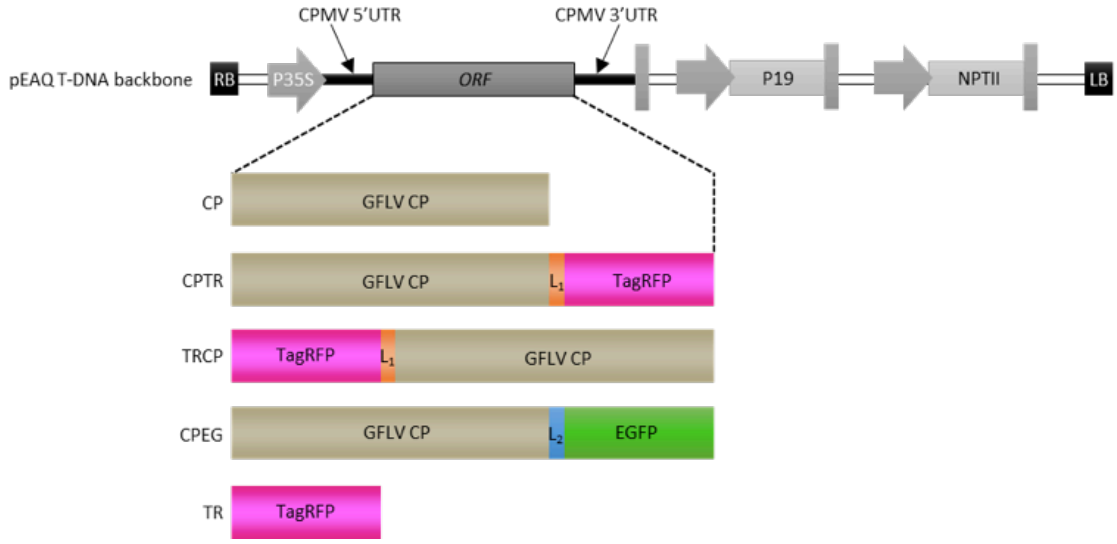


Figure 1 Schematic representation of pEAQ vector T-DNA region and constructs derived thereof. The backbone of the T-DNA region, extending from the right border (RB) to the left border (LB), is represented in grey shades. Open reading frame (ORF) of interest is flanked by sequences of *Cowpea mosaic virus* untranslated regions (CPMV UTRs) under control of *Cauliflower mosaic virus* 35S promotor (P35S). Native *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) coat protein (CP) as well as its TagRFP- and EGFP-tagged variants were introduced by Gateway cloning as schematically indicated. L1 corresponds to the 7-amino-acid Gly_3-Ser-Gly_3 linker sequence. L_2 corresponds to the 15-amino-acid linker resulting from Gateway recombination. Complete amino-acid-sequences of the expressed proteins are provided in Figure S1. P19: *Tombusvirus* P19 silencing suppressor. NPTII: neomycin phosphotransferase II gene.

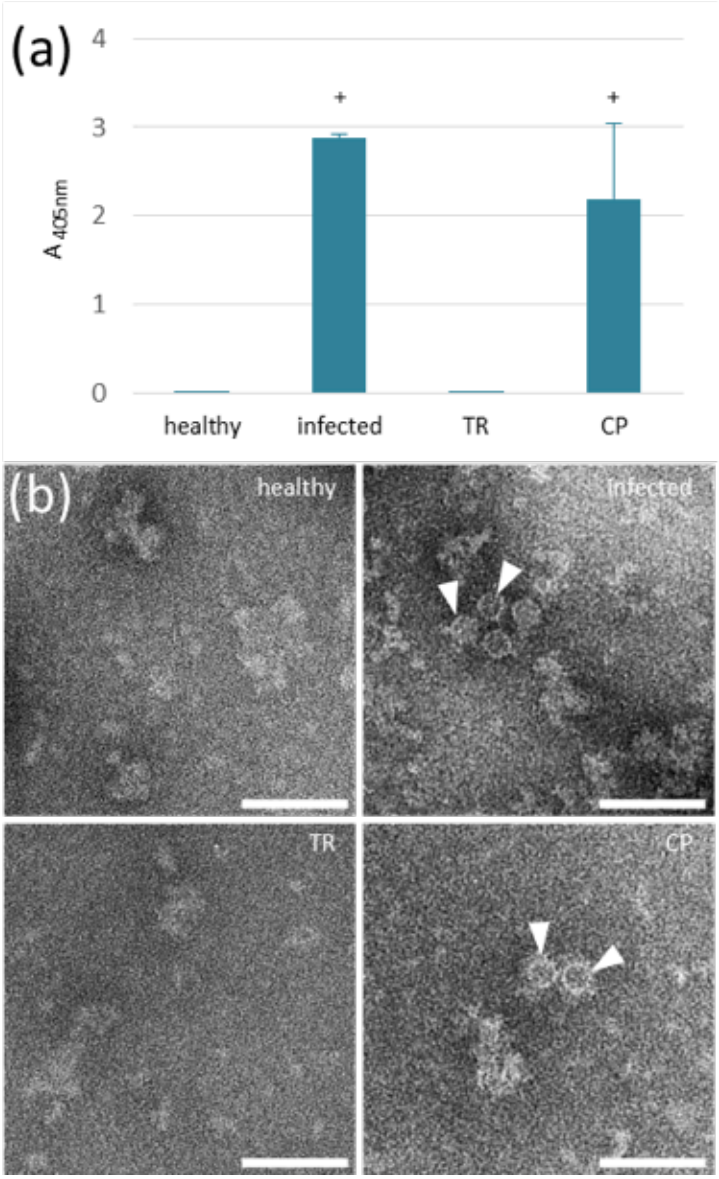


Figure 2 Transient expression of GFLV CP in *N. benthamiana* leaves leads to VLP production. (a) Expression of GFLV CP in *N. benthamiana* leaves at 7 days post-agroinfiltration or at 14 days post-infection was determined by DAS-ELISA using anti-GFLV antibodies for detection and *para*-nitrophenylphosphate as substrate for alkaline phosphatase. Bars represent the mean absorbance obtained with three different leaves for each condition. Error-bars correspond to 95 % confidence intervals. Samples were considered positive (+) when A_{405nm} exceeded the healthy control sample mean value by at least a factor of three. (b) ISEM micrographs resulting from observations performed on the same extracts than analyzed by DAS-ELISA. Approximately 30 nm particles (arrowheads) were detected only in GFLV-infected and CP expressing samples. Scale bars: 100 nm.

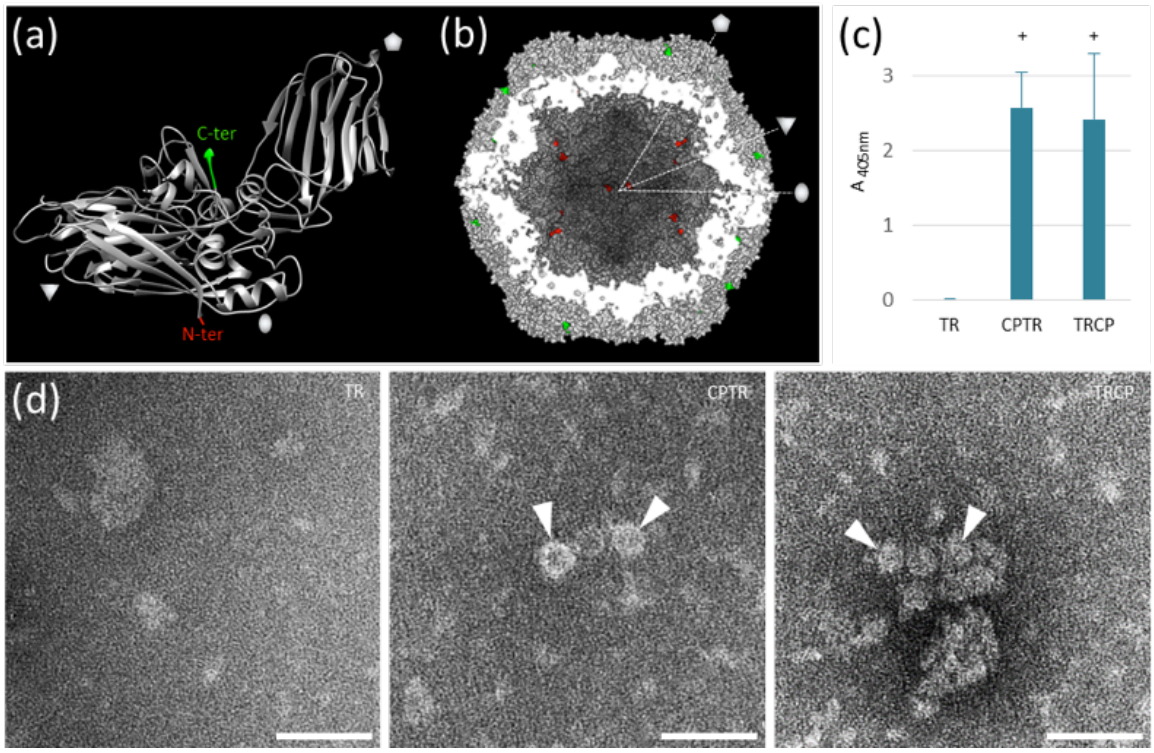


Figure 3 Fusion of TagRFP to the N- or C-terminal ends of GFLV CP is compatible with VLP formation. (a) Ribbon diagram view of a GFLV CP subunit and (b) surface-shaded cross-section of a particle according to the 3 Å resolution atomic structure (PDB code 4V5T, (Schellenberger et al., 2011b). Positions of the CP N- and C-termini are indicated in red and green, respectively. The pentagon, triangle and oval symbolize the icosahedral 5-fold, 3-fold and 2-fold icosahedral symmetry axes, respectively. Cross-section residues appear in white. (c) Expression of GFLV CP in *N. benthamiana* crude leaf extracts 7 days after agro-infiltration with TR, CPTR or TRCP. DAS-ELISA was performed using anti-GFLV antibodies and sample considered positive (+) when A_{405nm} value exceeded the healthy control sample mean value by at least a factor of three. Bars represent the mean absorbance obtained with three different leaves for each condition. Error-bars correspond to 95 % confidence intervals (d) ISEM micrographs resulting from observations performed on the same extracts than analyzed by DAS-ELISA. Arrowheads point to VLPs trapped by anti-GFLV antibodies in CPTR and TRCP clarified leaf extracts. Scale bars: 100 nm.

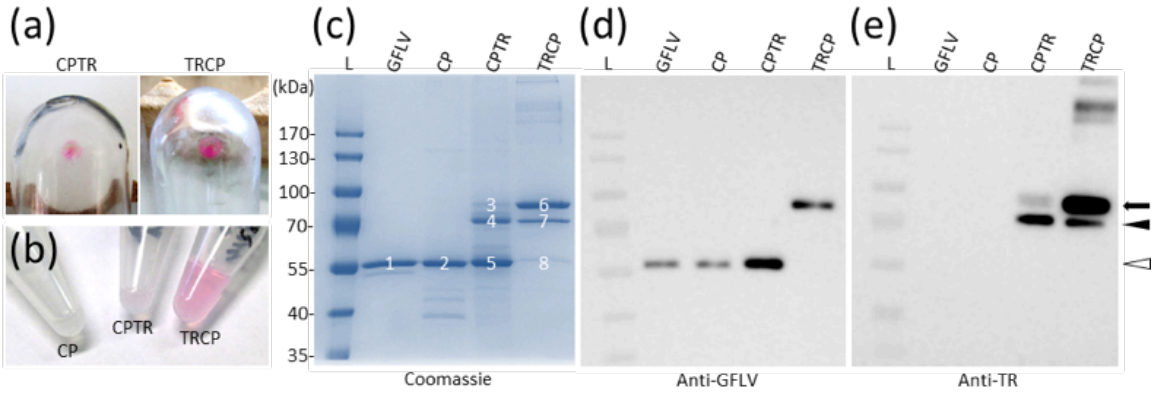
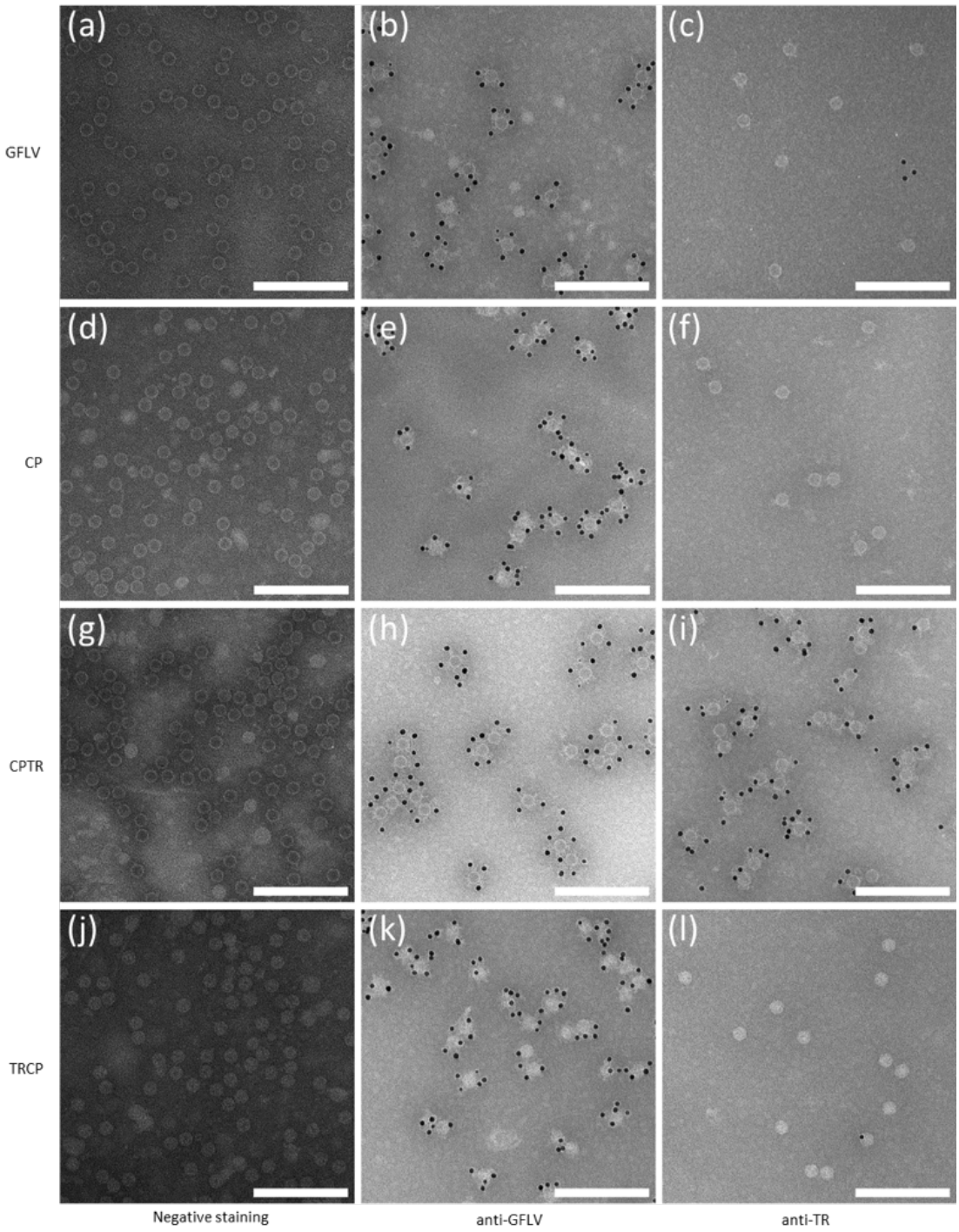
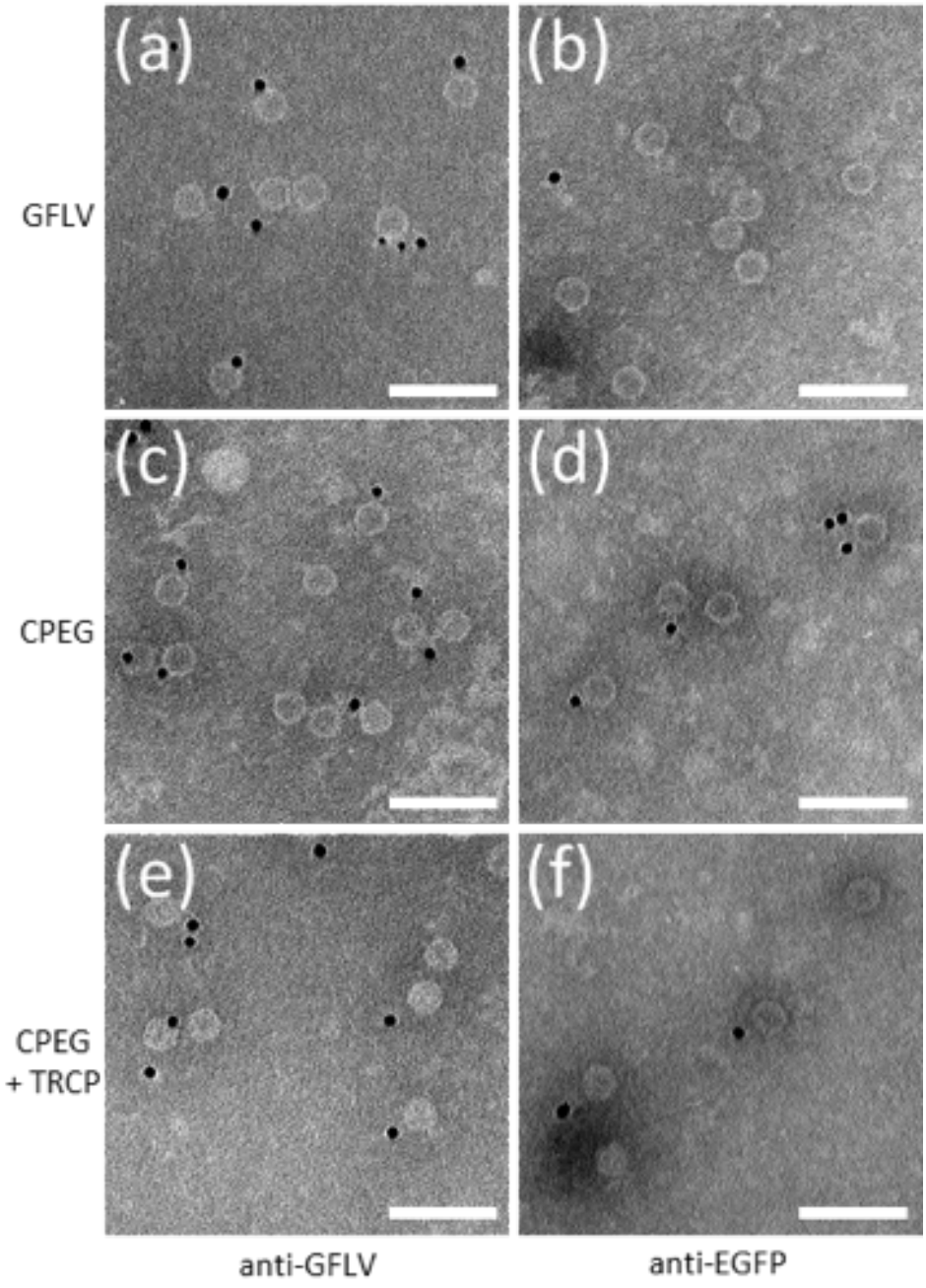


Figure 4 Recombinant VLPs can be purified from CP, CPTR and TRCP expressing leaves. (a) Pink pellets resulting from CPTR (left panel) and TRCP (right panel) purifications at final ultracentrifugation stage. (b) Purified CP, CPTR and TRCP in solution. Note the pink color of CPTR and TRCP samples. (c) Coomassie-blue stained gel of GFLV, CP, CPTR and TRCP purified particles after SDS-PAGE. 6 µg of GFLV-particles equivalent were separated in each lane. Major bands in the gel are numbered from 1 to 8. (d and e) Corresponding western blotting analyses of GFLV, CP, CPTR and TRCP samples using anti-GFLV (d) or anti-TagRFP (TR, e) antibodies. 0.05 µg of GFLV-particles equivalent were used in each lane. White arrowhead indicates bands with expected size for CP. Arrow points to bands with expected size for full-length TRCP and CPTR fusions, respectively. Black arrowhead points to major TRCP or CPTR truncated products. L: molecular mass markers. Mass (kDa) are indicated to the left.



678

679 **Figure 5** Protein fused to the N- or C-terminal end of GFLV CPs are encaged or exposed to the outer
680 surface of VLPs, respectively. Electron micrographs of purified GFLV (a, b, c), CP VLPs (d, e, f),
681 CPTR VLPs (g, h, i) and TRCP VLPs (j, k, l). Samples were processed for negative staining only (a, d,
682 g, j) or for ISEM using anti-GFLV (b, e, h, k) or anti-TR (c, f, i, l) antibodies and anti-rabbit
683 antibodies conjugated to 10 nm colloidal gold particles for decoration. Scale bars: 200 nm.



684

685 **Figure 6** VLPs can be purified from *N. benthamiana* leaves coexpressing CPEG and TRCP.
686 Transmission electron micrographs of purified GFLV (a, b), CPEG VLPs (c, d) and CPEG + TRCP
687 VLPs (e, f) after immunogold labeling. Samples were processed for ISEM using anti-GFLV (a, c, e) or
688 anti-EGFP (b, d, f) antibodies and particles decorated using anti-mouse antibodies conjugated to 10
689 nm colloidal gold. Scale bars: 100 nm.

690

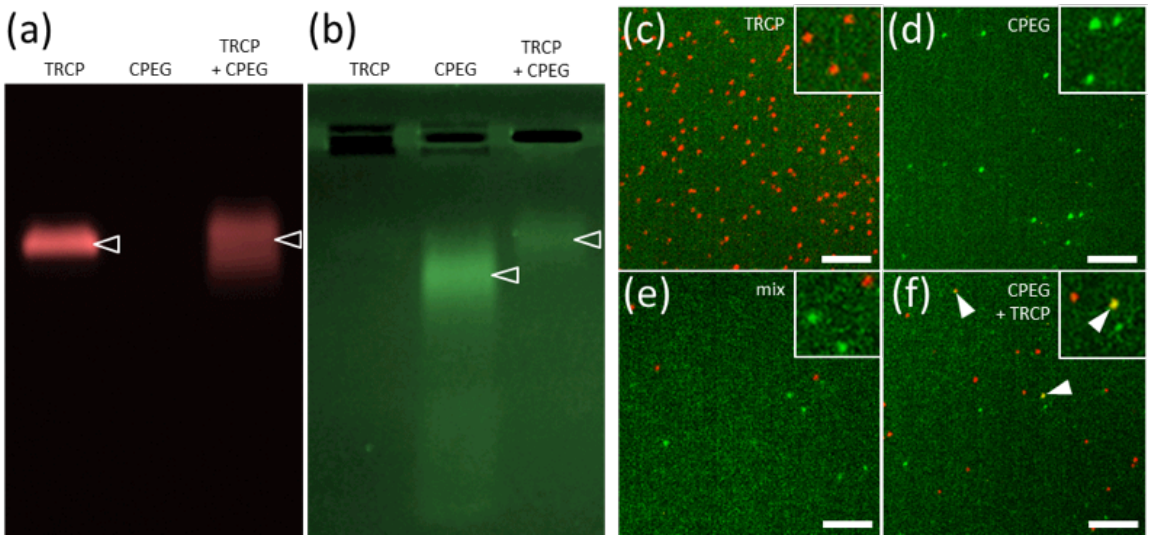


Figure 7 Hybrid VLPs are produced upon coexpression of CPEG and TRCP. (a, b) Fluorescent imaging of TRCP, CPEG or CPEG + TRCP VLPs separated by native agarose gel electrophoresis. Imaging was done sequentially using a G:box imaging system, first at an excitation of λ_{ex}480-540 nm and an emission of λ_{em}590-660 nm to detect TagRFP (a), then at λ_{ex}450-485 nm and λ_{em}510-540 nm to detect EGFP (b). Fluorescent VLPs in the gel are indicated by empty arrowheads. (c to f) Single particle microscopy images of purified TRCP (c), CPEG (d), mixed TRCP and CPEG VLPs at 1:1 ratio (e) and coexpressed CPEG + TRCP (f). Epifluorescence imaging was done sequentially at λ_{ex}455-495 nm - λ_{em}505-555 nm to detect EGFP and at λ_{ex}532.5-557.5 - λ_{em}570-640 nm to detect TagRFP. White arrowheads point at hybrid VLPs. Scale bars: 5 µm.

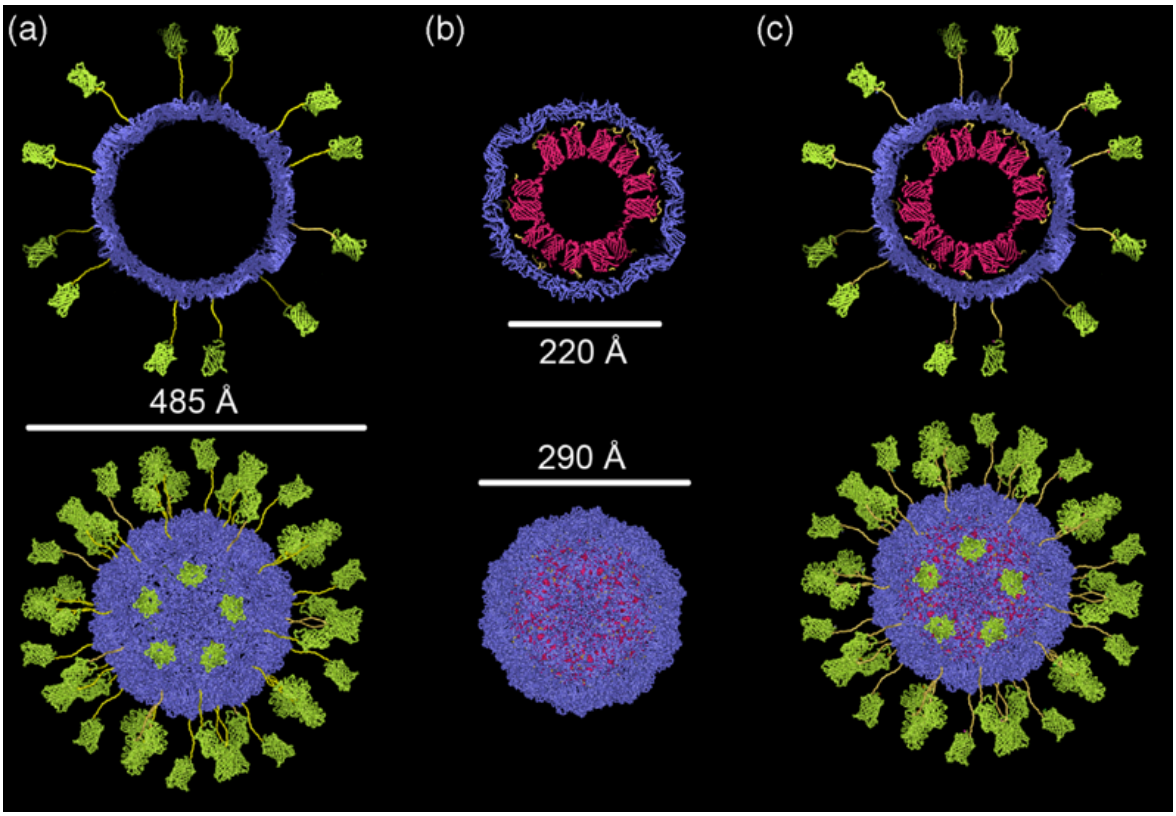
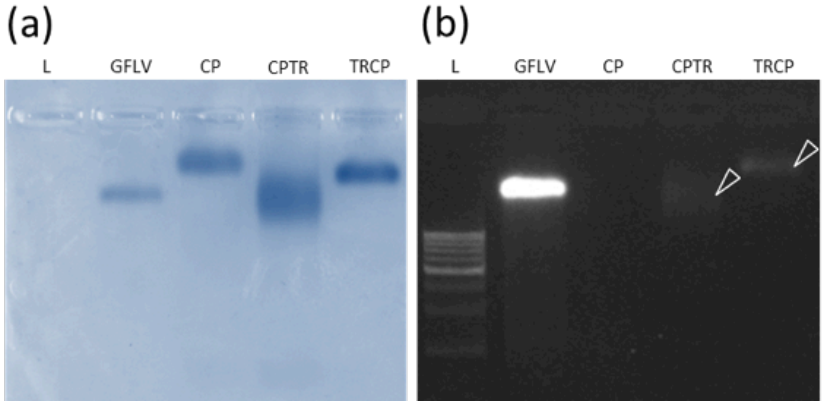


Figure 8 Models of fluorescent VLPs. (a) CPEG VLP including 60 CPs fused with GFP in C-terminal position. (b) TRCP VLP including 60 CPs fused with RFP in N-terminal position. (c) TRCPEG (hypothetical) VLP including 60 CPs fused with GFP in C-terminal and with RFP in N-terminal positions. All VLPs are depicted in the same orientation in CPs in ribbon representation, with the CP domain in blue, GFP in green, RFP in red and linker peptide in yellow.



(c)

	A_{260}/A_{280} ratios
GFLV	2.03
CP	1.02
CPTR	1.07
TRCP	0.89
CPEG	1.03
CPEG + TRCP	0.93

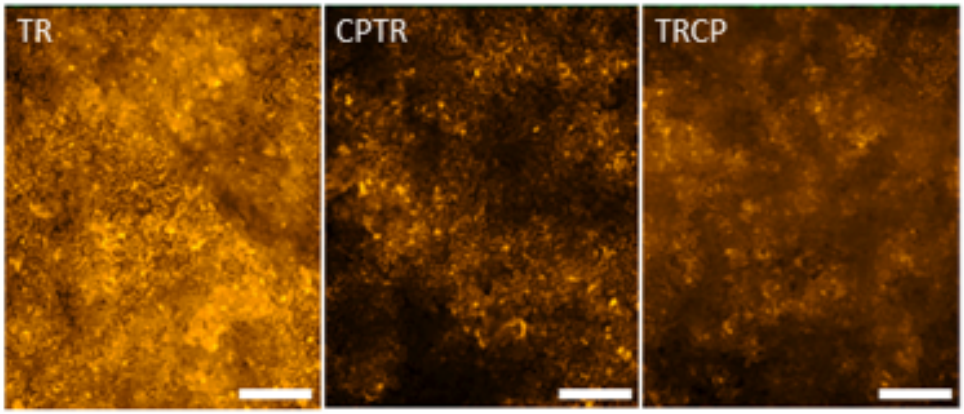
709

710 **Figure 9** Purified VLPs are nucleic acids-free. (a and b) Purified GFLV and CP, CPTR and TRCP
711 VLPs separated by native agarose gel electrophoresis after Coomassie blue (a) and ethidium bromide
712 staining (b). Arrowheads point to bands corresponding to cross-talk. (c) A_{260}/A_{280} ratios of purified
713 samples.

714

Supplementary figures

Figure S1 Complete amino-acids sequences of proteins used in this study and depicted in Figure 1. Residues corresponding to CP, TagRFP, EGFP, L_1 linker and L_2 linker are indicated in brown, pink, green, orange and blue, respectively.



721

722 **Figure S2** Epifluorescence macroscopy images of agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves

723 expressing TR, CPTR or TRCP. Scale bars: 300 µm.

724

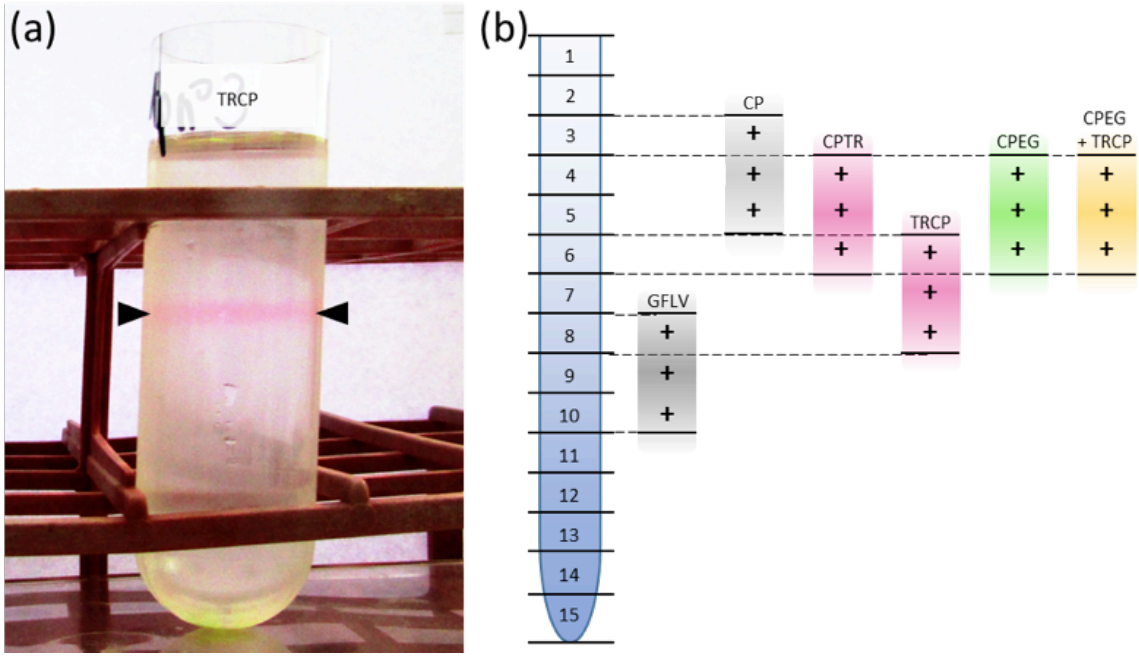
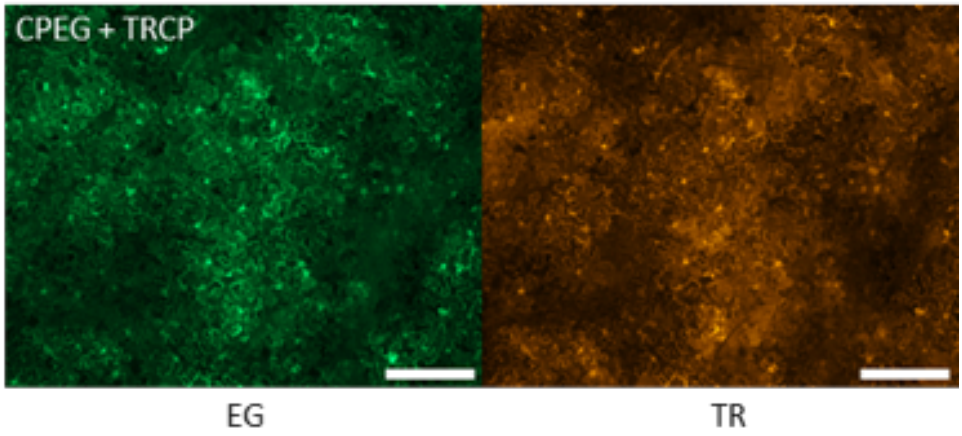


Figure S3 Additional information concerning the purification of VLPs. (a) Bright pink band after linear sucrose gradient centrifugation of TRCP VLPs. (b) Schematic representation of the location of virus- and VLP-enriched fractions in linear sucrose gradients. The collected 2 mL fractions are numbered from 1 (top of the gradient) to 15 (bottom). RNA-containing virions were localised measuring the A_{260} values of the different fractions. VLPs-enriched fractions were identified by semi-quantitative ELISA.

Figure S4 Coverage of GFLV CP, CP, CPTR and TRCP sequences obtained by NanoLC-MSMS analysis of bands 1 to 8 shown in Figure 4c. Primary amino-acid sequence of the full-length proteins are presented. Residues belonging to CP are indicated in bold. Sequence coverage identified by NanoLC-MSMS is indicated in red. Underlined residues correspond to first and last covered residues for each band. (a) MS analysis of band 1 (GFLV CP: 504 residues). Covered sequence starts with residue 6 and ends with residue 499. (b) MS analysis of band 2 (CP, 505 residues). Covered sequence starts with residue 2 and ends with residue 500. (c) MS analysis of bands 3, 4 and 5 (CPTR, 745 residues). Covered residues: 2-511 (band 5), 7-669 (band 4) and 7-739 (band 3). (d) MS analysis of bands 6, 7 and 8 (TRCP, 744 residues). Covered residues: 123-739 (band 8), 82-739 (band 7) and 2-739 (band 6). Untreated MS analysis results can be provided upon request.

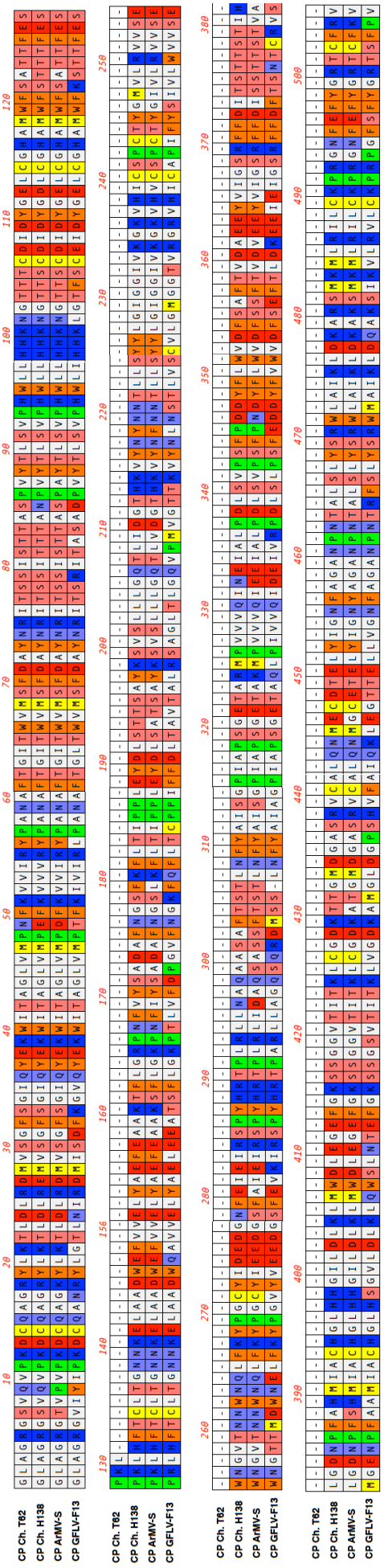


745

746 **Figure S5** Epifluorescent microscopy images of *Nicotiana benthamiana* leaves coexpressing CPEG
747 and TRCP at 5 days post infiltration. Channels corresponding to EGFP (EG) and TagRFP (TR)
748 emission are shown. Observation was done with an AxioZoom V16 macroscope (Zeiss, Germany).
749 Scale bars 300 µm.

Nom sur arbre	GenBank	Auteurs	Année	Région, Pays
AlsG1_C10b	C10b_EF426840	Vigne E, Marmonier A, Komar V, Lemaire O, Fuchs M (2009) Genetic structure and variability of virus populations in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. Virus Research 144: 154-162	2009	Alsace, France
AlsG2_C20a	C20a_FJ544931			
AlsG2_C5a	C5a_EF426831			
AlsG3_C9b	C9b_EF426839			
AlsG4_C19a	C19a_EF426850			
CA1_CACSB2	CACSB2-GU972577	Oliver JE, Vigne E, Fuchs M (2010) Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. Virus Research	2010	Californie, Etats-Unis
CA9_CAZINA2	CAZINA2_GU972572			
CA_CACSC1	CACSC1_GU972581			
Can_3138-01	3138-01_2C_JX513895	Rott,M.E., Belton,M. and Saeed,H.	2012	Canada
CH-80	CH-80_DQ526452	Engel,E.A., Arredondo,V.M. and Valenzuela,P.D.T.	2006	Chile
Ch_FL1	FL1_KC256955	Zamorano,A. and Fiore,N.	2014	Chili
Ch_FL1100	FL1100_KC256954			
Ch_FL177	FL177_KC256958			
Ch_FL4406	FL4406_KC256959			
Ch_FL4532	FL4532_KC256960			
Ch_FL70	FL70_KC256964			
Ch_FL785	FL785_KC256965			
Ch_FL81	FL81_KC256966			
Ch_FL92	FL92_KC256962			
ChampA_A17a	A17a_AY370956	Vigne E, Bergdoll M, Guyader S, Fuchs M (2004) Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. Journal of General Virology 85: 2435-2445	2004	Champagne
ChampA_A20a	A20a_AY370963			
ChampB_A17b	A17b_AY370957			
ChampB_A17c	A17c_AY370958			
ChampC_B2a	B2a_AY371011			
ChampD_A46b	A46b_AY370997			
ChampE_A17d	A17d_AY370959			
ChampG_A30c	A30c_AY370974			
ChampH_B6d	B6d_AY371020			
ChampI_A36a	A36a_AY370986			
Ger_NW	NW_AY017338	Wetzel T, Meunier L, Jaeger U, Reustle GM, Krczal G (2001) Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. Virus Res 75: 139-145	2001	Allemagne
Iran_Bonab	Bonab-2C-JQ071376	Zarghani SN, Shams-Bakhsh M, Bashir NS, Wetzel T (2013) Molecular Characterization of Whole Genomic RNA2 From Iranian Isolates of Grapevine Fanleaf Virus. Journal of Phytopathology 161: 419-425	2013	Iran
Iran_Shir-Amin	Shir-Amin-2C-JQ071374			
Iran_Takestan	Takestan-2C-JQ071377			
Iran_Urmia	Urmia-2C-JQ071375			
IranKH-11-10-1	IranKH-11-10-1-FJ513376	Sokhandan Bashir,N., Pashaei,A. and Doulati-Baneh,H.	2011	Iran
IranMK-14-1-3	IranMK-14-1-3_FJ513383			
It20	It20 _HG939477	Elbeaino T, Kiyi H, Boutarfa R, Minafra A, Martelli G, Digiaro M (2014) Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. Archives of virology 159: 2757-2764	2014	Italie
It21	It21_HG939480			
It24	It24_HG939478			
It34	It34_HG939479			

Nom sur arbre	GenBank	Auteurs	Année	Région, Pays
SACH44	SACH44_2C_KC900163	Lamprecht RL, Spaltman M, Stephan D, Wetzel T, Burger JT (2013) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of Grapevine fanleaf virus and its associated satellite RNA. Viruses 5: 1815-1823	2013	South Africa
SAPCS3	SAPCS3_2C_JF968121	Lamprecht R, Maree H, Stephan D, Burger J (2012) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of Grapevine fanleaf virus. Virus Genes: 1-5	2012	South Africa
Slo_Vol57c5	Vol57c5_DQ922678	Pompe-Novak M, Gutiérrez-Aguirre I, Vojvoda J, Blas M, Tomažič I, Vigne E, Fuchs M, Ravnikar M, Petrovič N (2007) Genetic variability within RNA2 of Grapevine fanleaf virus. European Journal of Plant Pathology 117: 307-312	2007	Slovénie
Slo_Vol57c2	Vol57c2_DQ922675			
Slo_Vol49c1	Vol49c1_DQ922658			
Tk55	Tk55_HG939483	Elbeaino T, Kiyi H, Boutarfa R, Minafra A, Martelli G, Digiaro M (2014) Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. Archives of virology 159: 2757-2764	2014	Turquie
Urs11	Urs11_HG939482			URSS
USA11	USA11_HG939481			USA
WACF2142	WACF2142 (GQ332371)	Mekuria TA, Gutha LR, Martin RR, Naidu RA (2009) Genome Diversity and Intra- and Interspecies Recombination Events in Grapevine fanleaf virus. Phytopathology 99: 1394-1402	2009	Washington state
WAME1492	WAME1492 (GQ332370)			
WAPN165	WAPN165 (GQ332365)			
WAPN173	WAPN173 (GQ332368)			
WAPN57	WAPN 57 (GQ332367)			
WAPN8133	WAPN8133 (GQ332369)			
SA_V1	EU702449	Liebenberg,A., Freeborough,M.J., Visser,C.J., Bellstedt,D.U. and Burger,J.T.	2009	South Africa
SA_Du	EU702447			
SA_S2 2441	EU702441			
Chi_Hangzhou	AJ318415	Li,H. and Zhou,X.	2001	Chine
Bra_RS	EU038294	Fajardo,T.V.M., Kuhn,G.B., Eiras,M. and Nickel,O.	2007	Brésil
It_FA31	DQ362932	Terlizzi,F., Biolchini,L. and Credi,R.	2006	Italie
It_FR113	DQ362935			
It_NE166	DQ362928			
It_DO221	DQ362920			
It_MS43	DQ362927			
It_SG12	DQ362925			
It_SG16	DQ362926			
It_SG10	DQ362923			
It_LS2	DQ362933			
It_SG1	DQ362921			



Annexe 4. Alignement de séquences protéiques des protéines de capside des isolats Ch. T62, Ch. H138, ArMV-S et GFLV-F13.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aballay, E., Prodan, S., Mårtensson, A. & Persson, P. Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode Xiphinema index. *Crop Prot.* **42,** 36–41 (2012).

Abawi, G. S. & Widmer, T. L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Appl. Soil Ecol.* **15,** 37–47 (2000).

Abskharon, R. N. N. *et al.* Probing the N-terminal-sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody. *J. Am. Chem. Soc.* **136,** 937–944 (2014).

Agran, M. *et al.* Occurrence of grapevine virus A (GVA) and other clostroviruses in Tunisian grapevines affected by leafroll disease. *Vitis* **29,** 43–48 (1990).

Ahmad, Z. A. *et al.* ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clin. Dev. Immunol.* **2012,** (2012).

Alexander, A *et al.* Gamma Heavy chain disease in man: cDNA sequence supports partial gene deletion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79,** 3260–3264 (1982).

Amari, K. *et al.* A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6,** 1–10 (2010).

Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V. & Ritzenthaler, C. Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog.* **7,** (2011).

Anderson, G. P. *et al.* Development of Antiricin Single Domain Antibodies Toward Detection and Therapeutic Reagents Development of Antiricin Single Domain Antibodies Toward Detection and Therapeutic Reagents. *Society* **80,** 9604–9611 (2008).

Anderson, G. P. & Goldman, E. R. TNT detection using llama antibodies and a two-step competitive fluid array immunoassay. *J. Immunol. Methods* **339,** 47–54 (2008).

Andret-Link, P. *et al.* Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* **86,** 183–195 (2004).

Ardekani, L. S. *et al.* A novel nanobody against urease activity of Helicobacter pylori. *Int. J. Infect. Dis.* **17,** e723–e728 (2013).

Argentieri, M. P. *et al.* Evaluation of nematicidal properties of saponins from Medicago spp. *Eur. J. Plant Pathol.* **120,** 189–197 (2008).

Ashour, J. *et al.* Intracellular Expression of Camelid Single-Domain Antibodies Specific for Influenza Virus Nucleoprotein Uncovers Distinct Features of Its Nuclear Localization. *J. Virol.* **89,** 2792–2800 (2015).

B

Bailon, P. *Affinity chromatography: methods and protocols*. (Springer Science & Business Media, 2000).

Baranova, E. *et al.* SbsB structure and lattice reconstruction unveil Ca2+ triggered S-layer assembly. *Nature* 25–28 (2012). doi:10.1038/nature11155

Barelle, C. & Porter, A. VNARs: An Ancient and Unique Repertoire of Molecules That Deliver Small, Soluble, Stable and High Affinity Binders of Proteins. *Antibodies* **4,** 240–258 (2015).

Beekwilder, J., Van Houwelingen, A., Van Beckhoven, J. & Speksnijder, A. Stable recombinant alpaca antibodies for detection of Tulip virus X. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 477–485 (2008).

Behar, G. *et al.* Isolation and characterization of anti-Fc-RIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **21,** 1–10 (2008).

Belin, C. & Schmitt, C. Involvement of RNA2-Encoded Proteins in the Specific Transmission of Grapevine Fanleaf Virus by Its Nematode Vector Xiphinema index. *Virology* **291,** 161–171 (2001).

Belin, C. *et al.* The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *J. Gen. Virol.* **80,** 1347–1356 (1999).

Belval, L., Hemmer, C., Sauter, C., Reinbold, C., Fauny, J.-D., Berthold, F., Ackerer, L., Schmitt-Keichinger, C., Lemaire, O., Demangeat, G. and Ritzenthaler, C. Display of whole proteins on inner and outer surfaces of Grapevine fanleaf virus-like particles. Plant Biotechnology Journal In press. (2016)

Benkert, P., Künzli, M. & Schwede, T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* **37,** 510–514 (2009).

Bercks, R. & Querfurth, G. The use of the latex test for the detection of distant serological relationships among plant viruses. *J. Gen. Virol.* **12,** 25–32 (1971).

Bester, R., Pepler, P. T., Burger, J. T. & Maree, H. J. Relative quantitation goes viral: An RT-qPCR assay for a grapevine virus. *J. Virol. Methods* **210,** 67–75 (2014).

Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. & Horwitz, A. H. Escherichia Coli Secretion of an Active Chimeric Antibody Fragment. *Science (80-).* **240,** 1041–1043 (1988).

Beuve, M., Candresse, T., Tannieres, M. & Lemaire, O. First report of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) in grapevine in France. *Plant Dis.* **99,** 293 (2015).

Beuve, M., Candresse, T., Tannieres, M. & Lemaire, O. First report of Grapevine redglobe virus (GRGV) in grapevine in France. *Plant Dis.* **99,** 422 (2015).

Biasini, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Res. 42, 1–7 (2014).

Bonavia, M. *et al.* Studies on 'corky rugose wood' of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. *Vitis* **35,** 53–58 (1996).

Boonham, N. *et al.* Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.* **186,** 20–31 (2014).

Borg, S. *et al.* An Intracellular nanotrap redirects proteins and organelles in live bacteria. *MBio* **6,** 1–10 (2015).

Boulila, M. Phylogeny and genetic recombination of Grapevine fanleaf virus isolates from naturally infected vineyard in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* **1,** 285–294 (2007).

Bouquet, A. Détection immunoenzymatique du virus du court-noué de la vigne dans son vecteur Xipinema index Thorne et Allen. (1983).

Broek, B. Van De, Devoogdt, N., Hollander, A. D., Gijs, H. & Jans, K. Speci fi c Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy. *ACS Nano* **5,** 4319–4328 (2011).

Brown, D. J. ., Robertson, W. M. & Trudgill, D. L. Transmission of viruses by plant nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33,** 223–49 (1995).

Brown, P. O. & Botstein, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* **21,** 33–7 (1999).

C

Cadman, C. Role of a dagger nematode (Xiphinema sp.) in out breaks of plant disease caused by Arabis mosaic virus. *Nature* **184,** 2003–2004 (1959).

Cadman. Sap-Transmissible viruses associated with disease of grapevines in Europe and North America. *Nature* **187,** 1048–1049 (1960).

Cadman. Biology of soil-borne viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* (1963).

Caljon, G., Hussain, S., Vermeiren, L. & Van Den Abbeele, J. Description of a Nanobody-based Competitive Immunoassay to Detect Tsetse Fly Exposure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9,** e0003456 (2015).

Campuzano, S. *et al.* Disposable amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma. *Biosens. Bioelectron.* **52,** 255–260 (2014).

Caussinus, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19,** 117–121 (2011).

Celebi-Toprak, F., Thompson, J. R., Perry, K. L. & Fuchs, M. Disease Notes Arabis mosaic virus in Grapevines in New York State. *Plant Dis.* **97,** 15–16 (2013).

Cepin, U. *et al.* A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of Grapevine fanleaf virus. *J. Virol. Methods* **170,** 47–56 (2010).

Chaikuad, A. *et al.* Structure of cyclin G-associated kinase (GAK) trapped in different conformations using nanobodies. *Biochem. J.* **459,** 59–69 (2014).

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157,** 220–33 (2009).

Chen, G. Y. *et al.* Graphene Oxide Nanosheets Modified with Single-Domain Antibodies for Rapid and Efficient Capture of Cells. *Chem. - A Eur. J.* **02142,** 17178–17183 (2015).

Chen, J. *et al.* Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Talanta* **147,** 523–530 (2016).

Chevalier, S., Greif, C., Walter, J. M. C. B. & Fritsch, C. Use of an Immunocapture-Polymerase Chain Reaction Procedure for the Detection of Grapevine Virus A in Koher Stem Grooving-Infected Grapevines. *J. Phytopathol.* **373,** 369–373 (1995).

Clark, M. F. Immunosorbent Assays in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19,** 83–106 (1981).

Clark, M. F. & Adams, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34,** 475–483 (1977).

Coetzee, B. *et al.* Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* **400,** 157–63 (2010).

Cogne, M., Preud'Homme, J.-L. & Guglielmi, P. Immunoglobulin gene alterations in human heavy chain diseases. *Res. Immunol.* **140,** 487–502 (1989).

Cogotzi, L. *et al.* An assay for the detection of grapevine leafroll-associated virus 3 using a single-chain fragment variable antibody. *Arch. Virol.* **154,** 19–26 (2009).

Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. Bioinformatics 20, 45–50 (2004).

Conrath, K. *et al.* Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J. Mol. Biol.* **350,** 112–125 (2005).

Conway, J. O., Sherwood, L. J., Collazo, M. T., Garza, J. A. & Hayhurst, A. Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents. *PLoS One* **5,** 1–12 (2010).

Crowther, J. . The ELISA guide book. *Methods Mol. Biol.* **149,** (2001).

D

Daane, K. M. *et al.* New controls investigated for vine mealybug. *Calif. Agric.* **60,** 31–38 (2006).

Daley-Bauer, L. P. *et al.* Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clin. Vaccine Immunol.* **17,** 2007–2015 (2010).

Dammeyer, T. & Tinnefeld, P. Engineered Fluorescent Proteins Illuminate the Bacterial Periplasm. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3,** 1–6 (2012).

Daragó, Á., Szabó, M., Hrács, K., Takács, a. & Nagy, P. I. In vitro investigations on the biological control of Xiphinema index with Trichoderma species. *Helminthologia* **50,** 132–137 (2013).

Das, S. & Raski, D. J. Vector-efficiency of Xiphinema index in the transmission of grapevine fanleaf virus. *Nematologica* **14,** 55–62 (1968).

De Genst, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 4586–91 (2006).

DeLano, W. PyMol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. CCP4 Newsl. protein Crystallogr. (2002).

De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* **32,** 263–270 (2014).

De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* **32,** 263–270 (2014).

Debrick, K. S. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* **56,** 652–653 (1973).

Della Pia, E. A. & Martinez, K. L. Single domain antibodies as a powerful tool for high quality surface plasmon resonance studies. *PLoS One* **10,** 1–17 (2015).

Demangeat, G. Nepovirus transmission by longidorid nematodes. *Transm. des Nepovirus par les nématodes longidoridae* **11,** 309–321 (2007).

Demangeat, G. Le court-noué de la vigne, Connaissance de la maladie. *Phytoma* **587,** (2005).

Demangeat, G., Komar, V., Cornuet, P., Esmenjaud, D. & Fuchs, M. Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single Xiphinema index nematode vector. *J. Virol. Methods* **122,** 79–86 (2004).

Demangeat, G. *et al.* Survival of Xiphinema index in Vineyard Soil and Retention of Grapevine fanleaf virus Over Extended Time in the Absence of Host Plants. *Phytopathology* **95,** 1151–1156 (2005).

Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A. & Cambillau, C. ScienceDirect Camelid nanobodies : killing two birds with one stone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32,** 1–8 (2015).

Desplancq, D. *et al.* Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *J. Immunol. Methods* **369,** 42–50 (2011).

Dias, H. F. & Harrison, B. D. The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol.* **51,** 97–105 (1963).

Dmitriev, O. Y., Lutsenko, S. & Muyldermans, S. Nanobodies As Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells. *J. Biol. Chem.* jbc.R115.679811 (2015). doi:10.1074/jbc.R115.679811

Dovas, C. I. & Katis, N. I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Viti v irus and Fo v ea v irus genera in grape v ine. **170,** (2003).

Domanska, K. *et al.* Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 1314–1319 (2011).

Dovas, C. I. & Katis, N. I. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *J. Virol. Methods* **109,** 217–226 (2003).

Drake, J., Charlesworth, B., Charlesworth, D. & Crow, J. Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* **148,** 1667–1686 (1998).

E

Eichmeier, A., Baránek, M. & Pidra, M. Analysis of genetic diversity and phylogeny of partial coat protein domain in Czech and Italian GFLV isolates. *Plant Prot. Sci.* **46,** 145–148 (2010).

Elbeaino, T., Digiaro, M., Ghebremeskel, S. & Martelli, G. P. Grapevine deformation virus: Completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Virus Res.* **166,** 136–140 (2012).

Engel, E. a *et al.* A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *J. Virol. Methods* **163,** 445–51 (2010).

Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3,** (2008).

Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay , Elisa : III . Quantitation of Specific Antibodies by Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes Information about subscribing to The Journal of. (2014).

Esmenjaud, D., Walter, B., Minot, J. C., Voisin, R. & Cornuet, P. Biotin-Avidin ELISA Detection of Grapevine Fanleaf Virus in the Vector Nematode Xiphinema index. *J. Nematol.* **25,** 401–5 (1993).

Esmenjaud, D. Les nématodes de la vigne. *Les Ravageurs de la vigne* 17–34 (2000).

Esmenjaud, D. & Bouquet, A. Selection and Application of Resistant Germplasm for Grapevine Nematodes. *Integr. Manag. Fruit Crop. abd For. nematodes* 195–214 (2009).

Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K. & Plückthun, A. Biophysical Properties of Camelid VHH Domains Compared to Those of Human V H 3 Domains †. *Biochemistry* **41,** 3628–3636 (2002).

F

Fatima, A. *et al.* Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. *PLoS One* **9,** e95263 (2014).

Fattouch, S. *et al.* RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants. *J. Virol. Methods* **127,** 126–132 (2005).

Fauquet, C. M. & Fargette, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol. J.* **2,** 64 (2005).

Feige, M. J. & Buchner, J. Principles and engineering of antibody folding and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 12–14 (2014). doi:10.1016/j.bbapap.2014.06.004

Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in Escherichia coli. *Bacteriology* **182,** 4068–4076 (2000).

Fernley, H. N. & Walker, P. G. Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem. J.* **104,** 1011–1018 (1967).

Finetti-Sialer, M. M. & Ciancio, a. Isolate-Specific Detection of Grapevine fanleaf virus from Xiphinema index Through DNA-Based Molecular Probes. *Phytopathology* **95,** 262–268 (2005).

Fischer, M. J. C. *et al.* Impact of Quillaja saponaria saponins on grapevine ecosystem organisms. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **100,** 197–206 (2011).

Flajnik, M. F., Deschacht, N. & Muyldermans, S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.* **9,** (2011).

Fraile, S., Jiménez, J. I., Gutiérrez, C. & de Lorenzo, V. NanoPad: an integrated platform for bacterial production of camel nanobodies aimed at detecting environmental biomarkers. *Proteomics* **13,** 2766–75 (2013).

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. & Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* **88,** 587–605 (2002).

Frantz, E. J. & Walker, M. a. Correlating ELISA values with the growth and yield components of GFLV infected grapevines. *Vitis* **34,** 131–132 (1995).

Frison, E. a. & Stace-Smith, R. Cross-reacting and heterospecific monoclonal antibodies produced against arabis mosaic nepovirus. *J. Gen. Virol.* **73,** 2525–2530 (1992).

Fuchs, M. Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes: état de l'art et perspectives. *Virologie* **12,** 27–37 (2008).

Fuchs, M. *et al.* The nucleotide sequence of satellite RNA in grapevine fanleaf virus, strain F13. *J. Gen. Virol.* **70,** 955–962 (1989).

Fuchs, M, Pinck, Etienne, P. and W. Characterization and Detection of GFLV using cDNA Probes (1991).

G

Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. & Ritzenthaler, C. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264,** 25–36 (1999).

Gambino, G. & Gribaudo, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* **96,** 1223–1229 (2006).

Gambino, G., Gribaudo, I., Schartl, A., Leopold, S. & Laimer, M. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep.* **25,** 546–553 (2006).

Gambino, G., Vallania, R. & Gribaudo, I. In situ localization of grapevine fanleaf virus and phloem-restricted viruses in embryogenic callus of Vitis vinifera. *Eur. J. Plant Pathol.* **127,** 557–570 (2010).

García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* **6,** 225–232 (2003).

Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Castellano, M. A., Boscia, D. & Martelli, G. . Properties of a new isolate of GLRAV2. *Vitis* **39,** 119–121 (2000).

Ghannam, A., Kumari, S., Muyldermans, S. & Abbady, A. Q. Camelid nanobodies with high affinity for broad bean mottle virus: a possible promising tool to immunomodulate plant resistance against viruses. *Plant Mol. Biol.* **87,** 355–369 (2015).

Giampetruzzi, A. *et al.* A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res.* **163,** 262–8 (2012).

Glasa, M. *et al.* Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch. Virol.* **159,** 2103–7 (2014).

Goldsmith, C. S. & Miller, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22,** 552–63 (2009).

Gong, X., Zhu, M., Li, G., Lu, X. & Wan, Y. Specific determination of influenza H7N2 virus based on biotinylated single-domain antibody from a phage-displayed library. *Anal. Biochem.* 1–7 (2015). doi:10.1016/j.ab.2015.09.020

Gottula, J. *et al.* Genetic Variability, Evolution and Biological Effects of Grapevine fanleaf virus Satellite RNAs. *Phytopathology* **103,** 1180–1187 (2013).

Gribaudo, I. *et al.* Monitoring the spread of viruses after vineyard replanting with heat-treated clones of Vitis Vinifera 'Nebbiolo'. *J. Plant Pathol.* **91,** 741–744 (2009).

Groll, N., Emele, F., Poetz, O. & Rothbauer, U. Towards multiplexed protein-protein interaction analysis using protein tag-specific nanobodies. *J. Proteomics* **127,** 289–299 (2015).

Guedon, J. T., Luo, K., Zhang, H. & Markham, R. B. Monoclonal and Single Domain Antibodies Targeting β-Integrin Subunits Block Sexual Transmission of HIV-1 in In Vitro and In Vivo Model Systems. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **69,** (2015).

H

Habili, B. Y. N. & Monis, J. Advances in Research : Grapvine Viruses. *Parctical Winer. Vineyard* 1–3 (2006).

Hagihara, Y. & Saerens, D. Improvement of single domain antibody stability by disulfide bond introduction. *Single Domain Antibodies Methods Protoc.* 399–416 (2012).

Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363,** 446–448 (1993).

Hans, F., Fuchs, L. M. & Pinck, L. Replication of grapevine fanleaf virus satellite RNA transcripts in Chenopodium quinoa protoplasts. *J. Gen. Virol.* **73,** 2517–2523 (1992).

Hans, F., Pinck, M. & Pinck, L. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). *Biochimie* **75,** 597–603 (1993).

Harmsen, M. M. & De Haard, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77,** 13–22 (2007).

Harrison, B. D. & Murant, a. F. Nematode transmissibility of pseudo -recombinant isolates of tomato black ring virus. *Ann. Appl. Biol.* **86,** 208–212

Harrison, R. A. *et al.* Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon* **47,** 364–368 (2006).

Hassazadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedecine* 1013–1026 (2013).

Hefferon, K. & Fuchs, M. Nepovirus replication. *Recent Adv. RNA virus replication* **661,** 1–17 (2006).

Helma, J., Cardoso, M. C., Muyldermans, S. & Leonhardt, H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J. Cell Biol.* **209,** 633–644 (2015).

Hemmer, C. H. *et al.* Transgenic Rootstocks Expressing Gflv Coat Protein Gene in a Three Years Field Trial Resistance Assessment, Impact on GFLV Diversity and Exchanges Between Rootstock and Scion. 2–3 (2009).

Hewitt, W. B., Goheen, A. C. & V. Gooding, G. J. Studies on Virus Diseases if the grapevine in California. *Vitis* **57,** (1962).

Hewitt, W. B., Raski, D. J. & Goheen, A. C. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* (1958).

Hewitt, W. B., Raski, D. J. & Goheen, A. C. Nematode Vector of soile borne fanleaf virus of Grapvines. *Phytopathology* **48,** 586–595 (1958).

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology. (N. Y).* **11,** 1026–1030 (1993).

Hmila, I. *et al.* A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* **24,** 3479–89 (2010).

138. Holtz, K. M. & Kantrowitz, E. R. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: Insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* **462,** 7–11 (1999).

Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O. & Herrbach, E. Grapevine virus A transmission by larvae of Parthenolecanium corni. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 185–188 (2008).

Huang, L., Muyldermans, S. & Saerens, D. Nanobodies®: proficient tools in diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **10,** 777–85 (2010).

Huss, B., Walter, B. & Fuchs, M. Cross-Protection Between Arabis Mosaic-Virus and Grapevine Fanleaf Virus Isolates in Chenopodium-Quinoa. *Ann. Appl. Biol.* **114,** 45–60 (1989).

Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. Current Protocols in Protein Science, 28-9.

Hwang, C. F. *et al.* Cloning and characterization of XiR1, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. *Theor. Appl. Genet.* **121,** 789–799 (2010).

I

Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y. P., Daubert, S. D. & Rowhani, a. Bermuda grass as a potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. *Plant Dis.* **87,** 1179–1182 (2003).

J

Janeway J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. Immunobiology: the immune system in health and disease. 1–21 (2005).

Jelly, N. S., Schellenbaum, P., Walter, B. & Maillot, P. Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Res.* **21,** 1319–1327 (2012).

Jha, A. & Posnette, A. Transmission of a virus to strawberry plants by a nematode. *Group* (1959).

Jiang, J. & Laliberté, J. F. The genome-linked protein VPg of plant viruses - A protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.* **1,** 347–354 (2011).

Jiang, W. *et al.* A rapid live-cell ELISA for characterizing antibodies against cell surface antigens of Chlamydomonas reinhardtii and its use in isolating algae from natural environments with related cell wall components. *BMC Plant Biol.* **14,** 244 (2014).

Jittavisutthikul, S. *et al.* Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. *Viruses* **7,** 2030–2056 (2015).

Jobling, S. a *et al.* Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **21,** 77–80 (2003).

Joosten, V. *et al.* Production of bifunctional proteins by Aspergillus awamori: llama variable heavy chain antibody fragment (V(HH)) R9 coupled to Arthromyces ramosus peroxidase (ARP). *J. Biotechnol.* **120,** 347–59 (2005).

K

Kandalaft, H. *et al.* Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against Clostridium difficile-associated disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99,** 8549–8562 (2015).

Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & Nakayama, K. Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.* **128,** 2351–62 (2015).

Kerschbaumer, R. J. *et al.* Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Biochem.* **249,** 219–27 (1997).

Kim, E. E. & Wyckoff, H. W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *J. Mol. Biol.* **218,** 449–464 (1991).

Kirchhofer, A. *et al.* Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17,** 133–8 (2010).

Kohler & Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predifined specificity. *Nature* **256,** (1975).

Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O. & Fuchs, M. Cross-Protection as Control Strategy Against Grapevine fanleaf virus in Naturally Infected Vineyards. *Plant Dis.* **92,** 1689–1694 (2008).

Koromyslova, A. D. & Hansman, G. S. Nanobody binding to a conserved epitope promotes norovirus particle disassembly. *J. Virol.* **89,** 2718–30 (2015).

Krebelj, A. J., Cepin, U., Ravnikar, M. & Novak, M. P. Spatio-temporal distribution of Grapevine fanleaf virus (GFLV) in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 159–171 (2015). doi:10.1007/s10658-015-0600-4

L

Ladenson, R. C., Crimmins, D. L., Landt, Y. & Ladenson, J. H. Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal. Chem.* **78,** 4501–4508 (2006).

Lahogue, F. & Boulard, G. Recherche de genes de resistance naturelle. *Vitis* **35,** 43–48 (1996).

Lai-Kee-Him, J. *et al.* The backbone model of the Arabis mosaic virus reveals new insights into functional domains of Nepovirus capsid. *J. Struct. Biol.* **182,** 1–9 (2013).

Laimer, M. *et al.* Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review. *J. Plant Pathol.* **91,** 7–23 (2009).

Lamprecht, R. L., Maree, H. J., Stephan, D. & Burger, J. T. Complete nucleotide sequence of a South African isolate of grapevine leafroll-associated virus 3 reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. *Virus Genes* **45,** 406–410 (2012).

Laporte, C. *et al.* Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **15,** 2058–2075 (2003).

Laveau *et al.* First Detection of Tomato Black Ring Virus (Tbrv) in a French Vineyard. **47,** 191–194 (2013).

Le Gall, O. *et al.* Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-

Le Maguet, J. *et al.* The role of the mealybug Phenacoccus aceris in the spread of Grapevine leafroll-associated virus -1 (GLRaV-1) in two French vineyards. *Eur. J. Plant Pathol.* **135,** 415–427 (2013).

Leduc, C. *et al.* A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging. *Nano Lett.* **13,** 1489–94 (2013).

Legin, R. Thermothérapie et multiplication in vitro d'apex de la vigne. Application à la séparation ou à !'élimination de diverses maladies de type viral et à !'évaluation des dégâts. *Acad. Agric. Fr.* **11,** 922–933 (1981).

Limasset, P. & Cornuet, P. Recherche de virus de la mosaïque du tabac (Marmor tabaci Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. *CR Acad. Sci* **228,** 1971–1972 (1949).

Lindner, P. *et al.* Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli using IMAC and histidine tails: A comparison of proteins and protocols. *Methods* **4,** 41–56 (1992).

Liu, X. *et al.* Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin a in cereal. *Anal. Chem.* **87,** 1387–1394 (2015).

López-Fabuel, I. *et al.* Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *J. Virol. Methods* **188,** 21–4 (2013).

Loris, R. *et al.* Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE. *J. Biol. Chem.* **278,** 28252–28257 (2003).

M

MacFarlane, S. a. Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Mol. Plant Pathol.* **4,** 211–215 (2003).

Maffey, L., Vega, C., Parreño, V. & Garaicoechea, L. Controlling Rotavirusassociated diarrhea: could Single-domain antibody fragments make the difference? *Rev. Argent. Microbiol.* **In Press,** (2015).

Maghuly, F. *et al.* Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep.* **25,** 546–553 (2006).

Mannervik, B., Helena Danielson, U. & Ketterer, B. Glutathione transferases—structure and catalytic activit. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **23,** 283–337 (1988).

Maree, H. J. *et al.* Grapevine leafroll-associated virus 3. *Front. Microbiol.* **4,** 1–21 (2013).

Margis, R. I. O. & Moltkulaire, B. Effects of site-directed Mutagenesis on the presumed catalytic triad and substrate-binding pocket of Grapevine Fanleaf Ne povirus 24kDa Proteinase. *Virology* **888,** 884–888 (1992).

Margis, R., Viry, M., Pinck, M. & Pinck, L. Cloning and in vitro characterization of the grapevine fanleaf virus proteinase cistron. *Virology* **185,** 779–787 (1991).

Margis, R., Ritzenthaler, C., Reinbolt, J., Pinck, M. & Pinck, L. Genome organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA2 deduced from the 122K polyprotein P2 in vitro cleavage products. *J. Gen. Virol.* **74,** 1919–1926 (1993).

Margis, R., Viry, M., Pinck, M., Bardonnet, N. & Pinck, L. Differential Proteolytic activities of precursor and mature forms of the 24K Proteinase of Grapevine fanleaf nepovirus. *Virology* 79–86 (1994).

Marmonier, a. *et al.* The coat protein determines the specificity of virus transmission by Xiphinema diversicaudatum. *J. Plant Pathol.* **92,** 275–279 (2010).

Marsian, J. & Lomonossoff, G. P. Molecular pharming—VLPs made in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37,** 201–206 (2016).

Martelli, G. Nematode-borne viruses of grapevine, their epidemiology and control. *Nematol. medit.* **6,** 1–27 (1978).

Martelli, G. & Boudon-Padieu, E. *Directory of infectious Diseases of Grapevines*. *Journal of the Electrochemical Society* **129,** (2006).

Martelli, G. P. Directory of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *J. Plant Pathol.* **96,** 1–136 (2014).

Martelli, G. P. & Hewitt, W. B. Comparative studies on some Italian and Californian virus diseases of Grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* **2,** 275–284 (1963).

Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H. & Candresse, T. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Res.* **188C,** 90–96 (2014).

McComb, R. B., Bowers, G. N. & Posen, S. *Alkaline Phosphatase*. *Plenum Press, New York* (1979).

Mcnamara, D. G. The survival of Xiphinema diversicaudatum in plant-free soil. *Nematologica* **26,** 170–181 (1980).

McPherson, A. & Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* **70,** 2–20 (2004).

Mekuria, T. a, Gutha, L. R., Martin, R. R. & Naidu, R. a. Genome diversity and intra- and interspecies recombination events in Grapevine fanleaf virus. *Phytopathology* **99,** 1394–1402 (2009).

Merzlyak, E. M. *et al.* Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* **4,** (2007).

Mikhaylova, M. *et al.* Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nat. Commun.* **6,** 7933 (2015).

Minafra, A. & Hadidi, A. Sensitive detection of grapevine virus A , B , or leafroll- associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA ampli ~ cation. **47,** (1994).

Murant, a F. & Mayo, M. a. Satellites of Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20,** 49–68 (1982).

Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74,** 277–302 (2001).

Muyldermans, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128,** 178–83 (2009).

Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82,** 775–97 (2013).

N

Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M. & Nakano, M. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Arch. Virol.* **153,** 1827–1832 (2008).

Naraghi-Arani, P., Daubert, S. & Rowhani, a. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *J. Gen. Virol.* **82,** 1791–1795 (2001).

Nassuth, A, Pollari, E., Helmeczy, K., Stewart, S. & Kofalvi, S. a. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods* **90,** 37–49 (2000).

Nguyen-Duc, T., Peeters, E., Muyldermans, S., Charlier, D. & Hassanzadeh-Ghassabeh, G. Nanobody-based chromatin immunoprecipitation/micro-array analysis for genome-wide identification of transcription factor DNA binding sites. *Nucleic Acids Res.* **41,** (2013).

Nölke, G. *et al.* Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and Arabis mosaic virus (ArMV) resistance in Nicotiana benthamiana. *Mol. Plant Pathol.* **10,** 41–49 (2009).

Nunez-Prado, N. *et al.* The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discov. Today* **00,** 1–7 (2015).

O

O'bannon, J. & Inserra, R. . Nematode vectors-transmission of plant viruses. *Nematol. Circ. No. 178* (1990).

Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H. & Jiggins, F. M. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364,** 99–115 (2009).

Oliver, J. E., Vigne, E. & Fuchs, M. Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Res.* **152,** 30–40 (2010).

Oliver, J. E. & Fuchs, M. F. Fanleaf degeneration / decline disease of grapevines. *Integr. Pest Manag.* 1–3 (2011).

Oliver, J. E. & Fuchs, M. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in vitis sp.: A virologist's perspective of the literature. *Am. J. Enol. Vitic.* **62,** 438–451 (2011).

Ollat, N. *et al.* Un porte-greffe contre le court-noué. *Phytoma* **649,** 29–33 (2011).

Olorunniji, F., Igunnu, A., Adebayo, J., Arise, R. & Malomo, S. Cofactor interactions in the activation of tissue non-specific alkaline phosphatase : Synergistic effects of Zn^{2+} and Mg^{2+} ions. *Niger. Soc. Exp. Biol.* **19,** 43–48 (2007).

Osman, F., Hodzic, E., Omanska-Klusek, A., Olineka, T. & Rowhani, A. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. *J. Virol. Methods* **194,** 138–45 (2013).

Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. & Rowhani, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. *J. Virol. Methods* **149,** 292–299 (2008).

Osman, F. & Rowhani, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* **133,** 130–6 (2006).

P

Panattoni, A., Luvisi, a. & Triolo, E. Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish J. Agric. Res.* **11,** 173–188 (2013).

Panattoni, A. & Triolo, E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* **125,** 63–67 (2010).

Paraschiv, G. *et al.* Epitope structure and binding affinity of single chain llama anti-β-amyloid antibodies revealed by proteolytic excision affinity-mass spectrometry. *J. Mol. Recognit.* **26,** 1–9 (2013).

Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* **9,** 674–93 (2014).

Pensec, F. *et al.* Gypsophila paniculata root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. *Aust. J. Grape Wine Res.* **19,** 439–445 (2013).

Perez, J. M. J. *et al.* Thermal unfolding of a llama antibody fragment: A two-state reversible process. *Biochemistry* **40,** 74–83 (2001).

Peyret, H. *et al.* Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PLoS One* **10,** 1–20 (2015).

Pietersen, G. *et al.* Control of grapevine leafroll disease spread at a commercial wine estate in South Africa: A case study. *Am. J. Enol. Vitic.* **64,** 296–305 (2013).

Pinck, L., Fuchs, M., Pinck, M., Ravelonandro, M. & Walter, B. A Satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus Strain F13. *J. Gen. Virol.* **69,** 233–239 (1988).

Pinck, M., Reinbolt, J., Loudes, a. M., Le Ret, M. & Pinck, L. Primary structure and location of the genome-linked protein 8VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *FEBS Lett.* **284,** 117–119 (1991).

Pollithy, A. *et al.* Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (nanobodies) in Magnetospirillum gryphiswaldense. *Appl. Environ. Microbiol.* **77,** 6165–6171 (2011).

Pompe-Novak, M. *et al.* Genetic variability within RNA2 of Grapevine fanleaf virus. *Eur. J. Plant Pathol.* **117,** 307–312 (2007).

Prasad, B., Schmid, M. *Chapitre 3 Principles of Virus Structural Organisation*. *Viral molecular machines* (2012). doi:10.1007/978-1-4614-0980-9

Q

Quacquarelli, A., Gallitelli, D., Savino, V. & Martelli, G. P. Properties of grapevine fanleaf virus. *J. Gen. Virol.* **32,** 349–360 (1976).

R

Raski, D. J., Goheen, A. C., Lider, L. A. & Meredith, C. P. Strategies against Grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Dis.* **67,** 335–339 (1983).

Rasmussen, S. G. F. *et al.* NIH Public Access. **469,** 175–180 (2011).

Ravn, U. *et al.* By-passing in vitro screening - Next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silico candidate selection. *Nucleic Acids Res.* **38,** 1–11 (2010).

Reddy, S. T. *et al.* Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol* **28,** 965–969 (2010).

Rettcher, S. *et al.* Simple and Portable Magnetic Immunoassay for Rapid Detection and Sensitive Quantification of Plant Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **81,** 3039–3048 (2015).

Richard, G. *et al.* In Vivo Neutralization of Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. *PLoS One* **8,** 1–14 (2013).

Ritzenthaler, C. *et al.* Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J. Virol.* **76,** 8808–8819 (2002).

Ritzenthaler, C. *et al.* Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *J. Gen. Virol.* **72,** 2357–2365 (1991).

Roberts, I. M. & Brown, D. J. F. Detection of six nepoviruses in their nematode vectors by immunosorbent electron microscopy. *Ann. Appl. Biol.* **96,** 187–192 (1980).

Robertson, W. M. & Henry, C. E. An association of carbohyfrates with particles of Arabis mosaic virus retained within Xiphinema diversicaudatum. *Ann. Appl. Biol.* **109,** 299–305 (1986).

Roossinck, M. J. The big unknown: plant virus biodiversity. *Curr. Opin. Virol.* **1,** 63–7 (2011).

Roovers, R. C. *et al.* Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **56,** 303–317 (2007).

Rossotti, M. A. *et al.* Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays. *Anal. Chem.* **87,** 11907–11914 (2015).

Rothbauer, U. *et al.* A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **7,** 282–289 (2007).

Rothbauer, U. *et al.* Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3,** 887–889 (2006).

Rowhani, A. Develpoment of Polymerase Chain Reaction Technique for the Detection of GFLV. (1993).

Rowhani, A., Maningas, M., Lile, L., Daubert, S., Golino, D., Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilised virions. *Phytopathology* **3,** 347–52 (1995).

Russo, M., Cohen, S. & Martelli, G. P. Virus-like particles in tomato plants affected by the yellow leaf curl disease. *J. Gen. Virol.* **49,** 209–213 (1980).

S

Saerens, D. *et al.* Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J. Biol. Chem.* **279,** 51965–51972 (2004).

Saerens, D. *et al.* Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* **352,** 597–607 (2005).

Saerens, D., Ghassabeh, G. H. & Muyldermans, S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8,** 600–608 (2008).

Saiki, R. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350 – 1354 (1985).

Saldarelli, P., Minafra, A. & Walter, B. A survey of Grapevine fanleaf nepovirus isolates for the presence of satellite RNA. *Vitis* **32,** 99–102 (1993).

Saldarelli, P. *et al.* Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. *J. Virol. Methods* **124,** 191–195 (2005).

Saldarelli, P., Montano, H. G. & Martelli, G. P. Non-radioactive molecular probes for the detection of three filamentous viruses of the grapevine. *Vitis* **33,** 157–160 (1994).

San Martín, Ricardo Magunacelaya, J. C. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of Quillaja saponaria. *Nematology* **7,** 577–585 (2005).

Sanfaçon, H. *et al.* Secoviridae: A proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Arch. Virol.* **154,** 899–907 (2009).

Scheich, C., Sievert, V. & Büssow, K. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *BMC Biotechnol.* **3,** 12 (2003).

Schellenberger, P. Caractérisation structurale et fonctionnelle de déterminants de la capside du Grapevine fanleaf virus impliqués dans la transmission par Xiphinema index. *Univ. Strasbg.* (2010).

Schellenberger, P. *et al.* Strategies for the crystallization of viruses: Using phase diagrams and gels to produce 3D crystals of Grapevine fanleaf virus. *J. Struct. Biol.* **174,** 344–351 (2011).

Schellenberger, P. *et al.* Structural insights into viral determinants of nematode mediated grapevine fanleaf virus transmission. *PLoS Pathog.* **7** (2011).

Schotte, L. *et al.* Characterization of Poliovirus Neutralization Escape Mutants of Single-Domain Antibody Fragments (VHHs). *Antimicrob. Agents Chemother.* **59,** 4695–4706 (2015).

Sentenac, G. Cochenilles De La Vigne. 1–17 (2012).

Serghini, M. a. *et al.* RNA2 of grapevine fanleaf virus: Sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.* **71,** 1433–1441 (1990).

Serruys, P. W. *et al.* Evaluation of the second generation of a bioresorbable everolimus drug-eluting vascular scaffold for treatment of de novo coronary artery stenosis: Six-month clinical and imaging outcomes. *Circulation* **122,** 2301–2312 (2010).

Shanmuganathan, N; Fletcher, G. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect fanleaf virus in grapevinesgrown in containers. *Plant Disease* **66,** 704–707 (1982).

Sherwood, L. J., Osborn, L. E., Carrion, Jr., R., Patterson, J. L. & Hayhurst, A. Rapid Assembly of Sensitive Antigen-Capture Assays for Marburg Virus, Using In Vitro Selection of Llama Single-Domain Antibodies, at Biosafety Level 4. *J. Infect. Dis.* **196,** S213–S219 (2007).

Siontorou, C. G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int. J. Nanomedicine* **8,** 4215–27 (2013).

Skerra, a & Plückthun, a. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* **240,** 1038–1041 (1988).

Smolarek, D., Bertrand, O. & Czerwinski, M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine ?*Postep. Hig Meg Dosw* 348–358 (2012).

Sokhandan-Bashir, N. & Melcher, U. Population genetic analysis of grapevine fanleaf virus. *Arch. Virol.* **157,** 1919–1929 (2012).

Steinhauer, D. a., Domingo, E. & Holland, J. J. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122,** 281–288 (1992).

Stijlemans, B. *et al.* Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies: African trypanosomes as paradigm. *J. Biol. Chem.* **279,** 1256–1261 (2004).

Strauss, M., Schotte, L., Thys, B., Filman, D. J. & Hogle, J. M. Five of five VHHs neutralizing poliovirus bind the receptor-binding site. *J. Virol.* JVI.03017–15 (2016). doi:10.1128/JVI.03017-15

Streltsov, V. A. *et al.* Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 12444–9 (2004).

Sudarshana, M. R., Perry, K. L. & Fuchs, M. F. Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an Emerging Threat to the Grapevine Industry. Phytopathology 105, 1026–1032 (2015).

Swain, M. D. *et al.* Immunodiagnostic reagents using llama single domain antibody-alkaline phosphatase fusion proteins. *Anal. Biochem.* **417,** 188–94 (2011).

Szychowsky, J. a. *et al.* The vein-banding disease syndrome: A synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. *Vitis* **34,** 229–232 (1995).

T

Tarr, A. W. *et al.* An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* **58,** 932–939 (2013).

Taylor, C. E. & Brown, D. J. . Nematode Vectors of Plant Viruses. *Integr. Pest Manag. Rev.* **4,** 270–271 (1997).

Terlizzi, F. *et al.* Genetic variability of the movement and coat protein genes of Grapevine fanleaf virus isolates from Italy. *J. Gen. Plant Pathol.* **81,** 63–67 (2015).

Terral, J. F. *et al.* Evolution and history of grapevine (Vitis vinifera) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Ann. Bot.* **105,** 443–455 (2010).

Thompson, J. R. *et al.* Profiling viral infections in grapevine using a randomly primed reverse transcription-polymerase chain reaction/macroarray multiplex platform. *Phytopathology* **104,** 211–9 (2014).

Thys, B. *et al.* In vitro antiviral activity of single domain antibody fragments against poliovirus. *Antiviral Res.* **87,** 257–264 (2010).

Tokuhara, D. *et al.* Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* **123,** 3829–3838 (2013).

Tu, Z. *et al.* Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of Listeria monocytogenes in milk. *Anal. Biochem.* **493,** 1–7 (2016).

Tudyka, T. & Skerra, a. Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of Escherichia coli. *Protein Sci.* **6,** 2180–2187 (1997).

U

Unkauf, T. *et al.* Generation of Recombinant Antibodies Against Toxins and Viruses by Phage Display for Diagnostics and Therapy. *Protein Target. Coumpounds* 55–76 (2015). doi:10.1007/978-3-319-22473-2

Uyemoto, J., Rowhani, A., Luvisi, D. & Krag, C. New closterovirus in 'Redglobe' grape causes decline of grafted plants. *Calif. Agric.* **55,** 28–31 (2001).

V

Vaneycken, I. *et al.* Immuno-imaging using nanobodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22,** 877–881 (2011).

Vanlandschoot, P. *et al.* Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral Res.* **92,** 389–407 (2011).

Vigne, E., Demangeat, G., Komar, V. & Fuchs, M. Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Arch. Virol.* **150,** 2241–2255 (2005).

Vigne, E., Marmonier, a. & Fuchs, M. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Arch. Virol.* **153,** 1771–1776 (2008).

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & Fuchs, M. Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: Evidence for mixed infection and recombination. *J. Gen. Virol.* **85,** 2435–2445 (2004).

Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Res.* **13,** 165–179 (2004).

Villate, L. *et al.* Spatial distribution of the dagger nematode Xiphinema index and its associated Grapevine fanleaf virus in French vineyard. *Phytopathology* **98,** 942–948 (2008).

Villate, L., Esmenjaud, D., Van Helden, M., Stoeckel, S. & Plantard, O. Genetic signature of amphimixis allows for the detection and fine scale localization of sexual reproduction events in a mainly parthenogenetic nematode. *Mol. Ecol.* **19,** 856–873 (2010).

Villate, L., Morin, E., Demangeat, G., Van Helden, M. & Esmenjaud, D. Populations by Fallow Plants Under Greenhouse and Field Conditions. *Phytopathology* **102,** 627–634 (2012).

Vincke, C. & Muyldermans, S. Introduction to Heacy chain antibodies and derived nanobodies. *Methods Mol.*

Viry, M. *et al.* Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *J. Gen. Virol.* **74,** 169–174 (1993).

Vivier, M. A. & Pretorius, I. S. Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millennium - a review. *South African J. Enol. Vitic.* **21,** 5–26 (2000).

Vuittenez, A. & Legin, R. Recherches sur les vecteurs naturels de la dégénérescence infectieuse. *Académie d'agriculture Fr.* 286–306 (1964).

Vuittenez, A., Munck, M., Kuszala, J. Souches de virus à haute agressivité isolées de vignes atteintes de dégénérescence infectieuse. *Virol. appl.* **5,** (1964).

W

Walper, S. a *et al.* Thermostable single domain antibody-maltose binding protein fusion for Bacillus anthracis spore protein BclA detection. *Anal. Biochem.* **447,** 64–73 (2014).

Walter. Sélection clonale de la vigne : sélection sanitaire et pomologique, influence des viroses. *Bull. l'OIV* 789–790 (1996).

Walter, B. *et al.* The Use of a Green–Grafting Technique for the Detection of Virus–like Diseases of the Grapevine. *J. Phytopathol.* **128,** 137–145 (1990).

Walter, B. Virus et viroses de la vigne : diagnostic et méthodes de lutte. *Virologie* **2,** 435–44 (1998).

Wang, Y. S., Motes, C. M., Mohamalawari, D. R. & Blancaflor, E. B. Green fluorescent protein fusions to Arabidopsis Fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell Motil. Cytoskeleton* **59,** 79–93 (2004).

Weil, C. M., Superior, E. P., Cantos, M., Troncoso, a. & Perez-Camacho, F. Regeneration of virus-free plants by in vitro chemotherapy of GFLV (grapevine fanleaf virus) infected explants of vitis vinifera cv zalema. *Acta Hortic.* **652,** 463–466 (2004).

Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* **198,** 157–74 (2009).

Wetzel, T., Bassler, A., Amren, M. a W. & Krczal, G. A RT/PCR-partial restriction enzymatic mapping (PREM) method for the molecular characterisation of the large satellite RNAs of Arabis mosaic virus isolates. *J. Virol. Methods* **132,** 97–103 (2006).

Wetzel, T. *et al.* Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* **101,** 63–69 (2002).

Wetzel, T., Chisholm, J., Bassler, A. & Sanfaçon, H. Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* **375,** 159–169 (2008).

Wiedbrauk, D. L. & Farkas, D. H. *Molecular methods for virus detection*. (Academic Press, 1995).

Wu, Q., Ding, S.-W., Zhang, Y. & Zhu, S. Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53,** 150605182533006 (2014).

Wyss. *Maintenance of Human, Animal, and Plant plathogen vectors* 251 (2000).

X

Xu, K. *et al.* Genetic and QTL analysis of resistance to Xiphinema index in a grapevine cross. *Theor. Appl. Genet.* **116,** 305–311 (2008).

Y

Yang, S. *et al.* Diagnosis of porcine circovirus type 2 infection with a combination of immunomagnetic beads, single-domain antibody, and fluorescent quantum dot probes. *Arch. Virol.* **160,** 2325–2334 (2015).

Yang, Y. *et al.* High-efficiency light-emitting devices based on quantum dots with tailored nanostructures. *Nat. Photonics* **9,** 1–9 (2015).

Youssef, S. A., Al-Dhaher, M. M. A. & Shalaby, A. A. Elimination of Grapevine fanleaf virus (GFLV) and Grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *Int. J. Virol.* **5,** 89–99 (2009).

Z

Zarschler, K., Witecy, S., Kapplusch, F., Foerster, C. & Stephan, H. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb. Cell Fact.* **12,** 97 (2013).

Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Golino, D. a & Rowhani, a. Nucleotide sequence and rt-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology* **88,** 1231–7 (1998).

Zhu, M. *et al.* Combining magnetic nanoparticle with biotinylated nanobodies for rapid and sensitive detection of influenza H3N2. *Nanoscale Res. Lett.* **9,** 528 (2014).

Léa Ackerer

Les Nanobodies, un nouvel outil de diagnostic de la maladie du court-noué de la vigne

Résumé

La maladie du court-noué est principalement causée en Europe par le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et l'*Arabis mosaic virus* (ArMV). Le principal moyen de lutte contre sa dispersion consiste à certifier l'absence de ces virus dans les vignes commercialisées par des méthodes sérologiques tels que le DAS-ELISA.

De par leurs propriétés biophysique et structurale exceptionnelles, les Nanobodies (Nb) issus des domaines variables d'immunoglobulines (Ig) composées uniquement de chaînes lourdes, se distinguent avantageusement des Ig conventionnelles. L'objectif majeur de ma thèse était d'établir un test de diagnostic du court-noué à base de Nb.

À partir de deux collections de Nb contre le GFLV et l'ArMV, j'ai identifié des Nb reconnaissant un large spectre d'isolats viraux. Leur fusion à une protéine fluorescente ou à la phosphatase alcaline a conduit à l'obtention de réactifs de détection performants du GFLV et de l'ArMV par DAS-ELISA.

La structure atomique d'un complexe Nb/GFLV résolue à 2.8 Å par cryomicroscopie électronique a permis de cartographier l'épitope en surface du virus et a révélé une couverture maximale de la particule virale par le Nb.

La comparaison des tests Nb à des réactifs sérologiques commerciaux a révélé leur supériorité en terme de sensibilité et de spécificité, ouvrant ainsi la voie à la commercialisation d'un nouveau test de diagnostic des virus du court-noué de la vigne.

Mots-clés : Nanobodies - Diagnostic – GFLV - ArMV - DAS-ELISA

Abstract

The grapevine fanleaf disease is mainly caused in Europe by the *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and the *Arabis mosaic virus* (ArMV). The principal mean to limit their spread, is to certify their absence in marketed grapevines by serological methods such as DAS-ELISA.

Their unique biophysical and structural properties make the variable domains of heavy chain-only immunoglobulin, called Nanobodies (Nb) a real asset for the development of a diagnostic test against fanleaf disease viruses.

I identified Nb able to detect a broad spectrum of viral isolates from two Nb collections against GFLV and ArMV. Their fusion to a fluorescent protein or to a bacterial alkaline phosphatase resulted in the production of efficient DAS-ELISA detection reagents.

The atomic structure of a Nb/GFLV complex was solved at 2.8 Å by cryoelectron microscopy, allowing the precise mapping of the viral epitope. This result showed a maximum coverage of the viral particle by the Nb, leading to a maximal signal in DAS-ELISA.

The full Nb tests against GFLV and ArMV were compared to commercial reagents and showed the superiority of the former in both sensitivity and specificity, opening the way for the development and commercialization of a new type of serological kits for the detection of grapevine viruses.

Keywords: Nanobodies - Diagnostic – GFLV - ArMV - DAS-ELISA