

ÉCOLE DOCTORALE 414

**Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS
UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Inra Colmar-UdS**

THÈSE présentée par :

Caroline HEMMER

soutenue le : **16 septembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline / Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Développement et utilisation de
Nanobodies dirigés contre le
Grapevine fanleaf virus (GFLV) en lutte
antivirale et comme biocapteur *in planta***

THÈSE dirigée par :

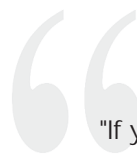
Dr Christophe RITZENTHALER Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEURS :

Pr Marc FUCHS Associate Professor, Cornell University
Pr Christophe ROBAGLIA Professeur, Aix-Marseille Université

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr Gérard DEMANGEAT Ingénieur de recherche, Inra
Dr Marie-Claude MAURO Moët-Hennessy Champagne & Services



"If you really look closely,
most overnight successes took a long time."

-Steve JOBS-

Remerciements

"I believe I can fly..."

C'était le refrain du sermon du révérend qui résonnait dans *l'Abyssinian Baptist Church, Harlem, New-York City*, lors de l'office du *Graduation Sunday* le 27 juin 2010. Alors qu'il exhortait en longues diatribes enflammées les membres séniors de la congrégation à pousser les nouveaux diplômés de l'année du haut de la falaise pour qu'ils prennent confiance dans leurs possibilités et s'envolent vers l'avenir, j'envisageais pour la première fois sérieusement la réalité de me lancer dans l'aventure de la thèse. Elle s'est avérée aussi exaltante et enrichissante qu'elle le promettait.

Merci à Christophe RITZENTHALER qui a poussé la selle du vélo et qui l'a lâchée de temps à autre, tout en restant à proximité pour rectifier la trajectoire et prévenir les grosses pertes d'équilibre. Je n'ai pas encore déboulonné et remisé les petites roues mais c'était grisant de sentir parfois la portance du vent sous mes propres ailes.

Merci à Gérard DEMANGEAT qui a été le premier à croire en moi et n'a jamais cessé de le faire même lorsque plus rien ne l'encourageait à le faire.

Merci à Corinne KEICHINGER qui a un cœur en or défiant les lois de la cardiologie et qui endosse mieux que quiconque la cape du chevalier blanc de la science pour porter secours aux étudiants égarés.

Merci à Serge MUYLDERMANS qui a partagé sans retenue son savoir sur les Nanobodies perpétuellement teinté par son enthousiasme scientifique.

Merci à Marc FUCHS, Marie-Claude MAURO, Serge POTIER et Christophe ROBAGLIA qui ont fait preuve d'une infinie et bienveillante patience en attendant ce manuscrit qui a joué l'Arlésienne et qui ont accepté de donner de leur temps pour l'évaluer.

Merci à tous les autres de Strasbourg, de Colmar et d'ailleurs que délibérément je ne nommerai pas. Tous ceux qui ont contribué, par leurs actes ou leur présence, de façon régulière ou ponctuelle, très concrète ou complètement anodine, à ce projet se reconnaîtront et savent déjà ma gratitude à leur égard.

Dernier merci à mes parents qui me supportent, dans tous les sens du terme, de manière inconditionnelle depuis mon premier jour et même un peu avant.



Table des matières

Abréviations	13
Chapitre 1	
Le Grapevine fanleaf virus	17
<u>1 La maladie du court-noué de la vigne</u>	<u>17</u>
1.1 Expression de la maladie	17
1.1.1 Symptômes sur la vigne	17
1.1.2 Conséquences agronomiques	19
1.2 Etiologie	19
1.3 Epidémiologie	21
1.3.1 Transmission par nématode	21
1.3.2 Autres voies de propagation	24
1.4 Méthodes de lutte	24
1.4.1 Ciblant le vecteur	24
1.4.2 Au niveau de la plante	25
<u>2 Le cycle viral du GFLV</u>	<u>26</u>
2.1 Génome	26
2.2 Réplication	27
2.3 Mouvement	31
2.4 Transmission	32
Chapitre 2	
Les Nanobodies	39
<u>1 Les IgG chez les camélidés</u>	<u>39</u>
1.1 Structure d'une IgG conventionnelle	39
1.2 Anticorps recombinants	41
1.3 Découverte des anticorps à chaînes lourdes	41
1.3.1 Historique	41
1.3.2 Structure	42
1.3.3 Rôle dans l'immunité des camélidés	42
1.3.4 Évolution	42
<u>2 Nanobody</u>	<u>43</u>
2.1 Structure d'un Nanobody	43
2.2 Réarrangement des gènes	45
2.3 Propriétés biophysicochimiques et avantages des Nanobodies	45

3 Applications des Nanobodies	46
3.1 Recherche	47
3.1.1 <i>Imagerie</i>	47
3.1.2 <i>Chaperonnes de cristallisation</i>	47
3.1.3 <i>Nanotrapping</i>	47
3.2 Diagnostic et détection	47
3.3 Thérapeutique	48
3.4 Défense et environnement	50
3.5 Perspectives	51
Objectifs du travail de thèse	53
Chapitre 3	
Obtention d'une collection de Nanobodies reconnaissant le GFLV	55
1 Développement de Nanobodies	55
1.1 Des anticorps recombinants faciles à obtenir	55
1.1.1 <i>Immunisation</i>	56
1.1.2 <i>Clonage du répertoire simple chaîne</i>	57
1.1.3 <i>Sélection des Nb</i>	58
1.1.4 <i>Production et purification</i>	61
1.2 Obtention de 23 Nanobodies anti-GFLV	63
1.2.1 <i>Construction d'une banque de VHH spécifiques</i>	63
1.2.2 <i>Criblage des banques</i>	65
1.3 Caractérisation préliminaire des Nanobodies obtenus	67
1.3.1 <i>Production et purification des Nb</i>	67
1.3.2 <i>Evaluation de la réactivité des Nb envers les mutants déficients pour la transmission</i>	70
2 Développement de Chromobodies	71
2.1 Production de Chromobodies purifiés	71
2.1.1 <i>Expression en bactéries</i>	71
2.1.2 <i>Expression transitoire en plante</i>	72
2.2 Expression stable de Chromobodies in planta	76
Chapitre 4	
Les Nanobodies induisent de la résistance au GFLV	79
1 Biotechnologies et résistance antivirale	79
1.1 Contexte historique	79
1.1.1 <i>Résistance dérivée du pathogène</i>	79
1.1.2 <i>Sources non virales de résistance par transgénèse</i>	80
1.2 Résistance induite par les protéines	82

1.2.1 Expression de protéine de capsid	82
1.2.2 Expression de réplicase	84
1.2.3 Expression de protéine de mouvement	85
1.2.4 Expression d'autres protéines virales	85
1.2.5 Expression de plantibodies	86
1.3 Résistance induite par l'ARN	87
1.3.1 Mécanisme du PTGS dans les plantes	87
1.3.2 Stratégie hpRNA source de siRNA	89
1.3.3 Stratégie amiRNA	90
1.4 Polémiques autour des plantes transgéniques	90
1.5 Résistance au GFLV	91
1.5.1 Expression de CP	91
1.5.2 Stratégie hpRNA, amiRNA	92
1.5.3 Expression de scFv	92
<u>2 Résistance au GFLV induite par l'expression de Nanobodies</u>	92
2.1 Valorisation par publications écrites	92
2.1.1 Des résultats, un brevet et un article	92
2.1.2 Article en préparation	95
2.2 Remarques complémentaires	128
2.2.1 Présence de P19	128
2.2.2 Mécanisme de la résistance	128
2.2.3 Perspectives du contournement de la résistance	133
Chapitre 5	
Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV	137
<u>1 Comment suivre une infection virale ?</u>	137
1.1 Pourquoi et comment visualiser un virus in vivo ?	137
1.2 Quelles solutions pour suivre le GFLV ?	138
1.3 Quelles utilisations des Nanobodies en imagerie ?	139
<u>2 Utilisation des Nanobodies pour suivre le GFLV</u>	140
2.1 In planta	140
2.2 Ex vivo	146
Conclusions et perspectives	149
Références bibliographiques	155

Table des illustrations

Encadrés

Encadré 1.1 Symptômes du court-noué sur vigne	18
Encadré 1.2 <i>Xiphinema index</i>	22
Encadré 1.3 Génome du GFLV	28
Encadré 1.4 Cycle cellulaire du GFLV	30
Encadré 1.5 Déterminants de la spécificité de transmission du GFLV	35
Encadré 2.1 Les anticorps	40

Figures

Figure 1.1 Comparaison ultra-structurale des sites de réplication du poliovirus, du GFLV et du <i>Bovine enterovirus</i> (BEV) observés par microscopie électronique.	29
Figure 1.2 Comparaison des symptômes observés sur feuilles systémiques de <i>N. benthamiana</i> 6 à 12 jours après inoculation de différentes souches de GFLV (Vigne <i>et al</i> , 2013).	31
Figure 1.3 Récapitulatif des études ayant démontré la détermination de la spécificité de transmission du GFLV par <i>X. index</i> et de l'ArMV par <i>X. diversicaudatum</i> .	33
Figure 2.1 Structure primaire et tertiaire des V _H H.	44
Figure 3.1 Vue d'ensemble des différentes étapes de la procédure classique d'obtention d'un Nb.	55
Figure 3.2 Stratégie de clonage des Nb.	57
Figure 3.3 Principe du <i>biopanning</i> par <i>phage display</i> .	60
Figure 3.4 Carte simplifiée du phagemide pHEN4 (d'après Ghassabeh <i>et al</i> , 2010).	64
Figure 3.5 Exemples représentatifs de la qualité de purification des Nb.	68
Figure 3.6 Évaluation de la réactivité des Nb purifiés envers le GFLV-F13, -TD et -G2.	69
Figure 3.7 Évaluation de la pureté des purifications virales utilisées pour la caractérisation des Nb.	70
Figure 3.8 Schéma représentatif des constructions utilisées pour l'expression de Cb en plante.	73
Figure 3.9 Les Nb sont solubles et fonctionnels dans <i>N. benthamiana</i> .	74
Figure 3.10 Expression de Cb par sécrétion apoplastique dans <i>N. benthamiana</i> .	75
Figure 3.11 Expression transitoire de Cb en contexte viral.	77
Figure 3.12 Évaluation de la fluorescence des lignées transgéniques T0 Nb23:EGFP et EGFP.	78
Figure 4.1 Biogenèse et mécanisme d'action des sRNA (A, B) mimés pour générer de la résistance aux virus (C, D).	89
Figure 4.2 Analyse par RT-qPCR de l'accumulation de l'ARN1 du virus challenger et des transcrits de Nb23:EGFP et de P19 dans les lignées 23EG.	129
Figure 4.3 Relation entre accumulation des transcrits du Cb et accumulation virale dans les plantes de la lignée T1 23EG37.	130
Figure 4.4 Analyse de l'accumulation des transcrits de Cb dans les plantes des lignées T2 homozygotes 23EG16-9 et 23EG38-4 après confrontation avec le GFLV.	131
Figure 4.5 Le Nb23:EGFP semble relocalisé par l'expression transitoire de la P2.	132
Figure 4.6 Empreinte du Nb23 sur la capsid du GFLV-F13.	133
Figure 4.7 Détection par ISEM de particules virales de GFLV-CP+3 dans des plantes transgéniques EG11-3 (A) et 23EG16-9 (B).	134
Figure 4.8 Cartographie putative de l'épitope du Nb122.	135
Figure 4.9 Symptômes atypiques parfois observés sur les plantes transgéniques exprimant le Nb23:EGFP.	135

Figure 4.10 Relocalisation du Nb23:EGFP par le mutant GFLV-CP+3.	136
Fig. 1 Nb23 recognizes GFLV and virus neutralization occurs at the cellular level.	104
Fig. 2 The 2.8 Å resolution cryo-EM structure of the GFLV-Nb23 complex.	105
Fig. 3 Overcoming Nb23-mediated resistance can occur at the expense of transmission.	106
Extended Data Fig. 1 Phylogenetic tree of Nanobodies (Nbs) directed against GFLV.	116
Extended Data Fig. 2 Unrooted phylogenetic tree reconstructed from the amino acid sequence of the CP of the eight GFLV isolates and ArMV-S.	117
Extended Data Fig. 3 Evaluation of T1 transgenic <i>N. benthamiana</i> lines challenged with GFLV-GHu.	118
Extended Data Fig. 4 Characterization of homozygous T2 transgenic lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4.	119
Extended Data Fig. 5 Evaluation of the resistance of transgenic <i>N. benthamiana</i> T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by GFLV-GHu or ArMV-S.	120
Extended Data Fig. 6 Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by various GFLV isolates.	121
Extended Data Fig. 7 Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by viral RNA.	122
Extended Data Fig. 8 Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to GFLV inoculation by <i>X. index</i> .	123
Extended Data Fig. 9 Cryo-EM micrographs and estimation of the resolution of the GFLV-Nb23 complex.	124
Extended Data Fig. 10 Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to GFLV at high pressure of inoculum.	125
Extended Data Fig. 11 Mutations found in GFLV escape variants locate to the outer surface of the CP.	126
Extended Data Fig. 12 Reduced affinity of Nb23 towards GFLV-CP+3 and GFLV-Tyr ₂₁₆ His.	127
Figure 5.1 Suivi de l'infection de plantes herbacées par le virus recombinant GFLV-2ATR exprimant la protéine 2AHP en fusion avec la TagRFP.	139
Figure 5.2 Relocalisation du Nb:23EGFP lors de l'infection par le GFLV-2ATR.	141
Figure 5.3 Le Nb23:EGFP met en évidence toutes les structures cellulaires connues du GFLV.	142
Figure 5.4 Relocalisation du Nb23:EGFP lors de l'expression transitoire de 2C ^{CP} dans des plantes 23EG16-9.	143
Figure 5.5 Les variants contournant la résistance sont reconnus in vivo par le Nb23:EGFP.	144
Figure 5.6 Le GFLV-CPTR est compétent pour former des sites d'infection dans <i>C. quinoa</i> .	145
Figure 5.7 Le variant GFLV-CP+3 est reconnu in vivo par les Nb23:EGFP et Nb122:TRFP.	146
Figure 5.8 Immunomarquage à l'aide du Nbp59:TRFP des sites de rétention du GFLV-F13 dans <i>X. index</i> .	147
Figure 6.1 Nombre de publications traitant des Nb entre 1993 et juillet 2015.	149
Figure 6.2 Plantule de vigne en culture <i>in vitro</i> exprimant le Nb23:EGFP.	151
Figure 6.3 Le Nb122:TRFP et le Nbp59:TRFP sont des biocapteurs efficaces du GFLV.	152

Tableaux

Tableau 1.1 Seize espèces virales de la famille des <i>Secoviridae</i> sont à l'origine de la maladie du court-noué.	20
Tableau 3.1 Principales caractéristiques des 23 Nb anti-GFLV sélectionnés.	66
Table 1 Nb23:EGFP confers broad range resistance to GFLV but not to ArMV in transgenic <i>N. benthamiana</i> .	109
Extended Data Table 1 List of primers used for Nbs cloning and virus site directed mutagenesis.	113
Extended Data Table 2 List of primers used for qPCR.	113

Abréviations

ADN...acide désoxyribonucléique

AGO...protéine ARGONAUTE

amiRNA...micro ARN artificiels (*artificial micro RNA*)

ANR...Agence Nationale de la Recherche

ARN...acide ribonucléique

BSA...*Bovine serum albumin*

Cb...Chromobody

cDNA...ADN complémentaire (*complementary DNA*)

CDR...*Complementarity Determining Region*

CFP...*Cyan Fluorescent Protein*

C_H...domaine constant de chaîne lourde d'IgG

C_L...domaine constant de chaîne légère d'IgG

CNRS...Centre National de la Recherche Scientifique

CP...protéine de capsid (*capsid protein*)

CRISPR... famille de séquence répétées (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

cryo-EM...cryo-microscopie électronique (*single particle cryo-electron microscopy*)

DARPs...*Designed Ankyrin Repeat Proteins*

DCL...*DICER-like protein*

dpi...*jours après inoculation (days post inoculation)*

DRB...*double-stranded-RNA-binding*

DsbC...*Disulfide bond isomerase C*

dsRNA...ARN double brin (*double-strand RNA*)

EGFP...*Enhanced Green Fluorescent Protein*

ELISA...*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Fab...*Fragment, antigen binding*

Fc...*Fragment, crystallizable*

FR...*Framework Region*

GFP...*Green Fluorescent Protein*

HA...séquence dérivée du gène codant pour l'hémagglutinine du *Human influenza virus*

HCAb...anticorps à chaînes lourdes (*Heavy Chain only Antibody*)

HEN...protéine *HUA Enhancer*

HER2...*human epidermal growth factor receptor 2*

HPF...*high pressure freezing*

hpRNA...ARN en tige boucle (*hairpin RNA*)

IBMC...Institut de biologie moléculaire et cellulaire

IBMP... Institut de biologie moléculaire des plantes

IFV...Institut Français de la Vigne et du Vin

IGBMC...Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

IgG...Immunoglobuline G

IgNAR...*Immunoglobulin New Antigen Receptor*

Abréviations

IgW...Immunoglobuline W
IMAC...*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*
Inra...Institut national de la recherche agronomique
ISEM...*ImmunoSorbent Electron Microscopy*
miRNA...micro ARN (*micro RNA*)
MP...protéine de mouvement (*movement protein*)
mRNA...acide ribonucléique messenger (*messenger RNA*)
Nb...Nanobody
NSF...*Nanobody Service Facility*
OGM... organisme génétiquement modifié
ORF...cadre ouvert de lecture (*Open Reading Frame*)
PAP...*pokeweed anti-viral proteins*
PCNA...*proliferating cell nuclear antigen*
PCR...*Polymerase Chain Reaction*
PDLP...*Plasmodesmata located proteins*
PDR...*pathogen-derived resistance*
PE-ELISA...*Periplasmic Extract Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
pNPP...para-nitrophényl phosphate
PTGS...*post transcriptional gene silencing*
PVDF...*Polyvinylidene difluoride*
QTL...locus de caractère quantitatif (*quantitative trait locus*)
RDR...ARN polymérase ARN-dépendante (*RNA-dependent RNA polymerase*)
RdRp...ARN polymérase ARN-dépendante (*RNA-dependent RNA polymerase*)
Rep...*replication associated protein*
RISC...*RNA induced silencing complex*
RIVEM...*Radial Interpretation of Virus Electron-density Map*
RMN...résonnance magnétique nucléaire
RNP...ribonucléoprotéine
RT-PCR...*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
scFv...*single-chain variable fragment*
sdAb...*single domain antibody*
SDS-PAGE...*Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SEC...*Size Exclusion Chromatography*
SEL...*size exclusion limit*
sfGFP...*superfolder Green Fluorescent Protein*
siRNA...*small interfering RNA*
sRNA...petits ARN non codant (*small RNA*)
ssRNA...ARN simple brin (*single strand RNA*)
T-DNA...fragment d'ADN transférable à la plante (*transfer DNA*)
TagRFP ou **TRFP**...*Tag Red Fluorescent Protein*
TGB...*triple gene block*
TGS...*transcriptional gene silencing*
TNF...*Tumor necrosis factor*
TRFP ou **TagRFP**...*Tag Red Fluorescent Protein*

TSP...*Total Soluble Proteins*

UPR...*unfolded protein response*

UTR...*untranslated region*

V-NAR...*domaine variable d'IgNAR (new antigen receptor variable domain)*

V_H...*domaine variable de chaîne lourde d'IgG*

V_HH...*domaine variable d'anticorps à chaînes lourdes (heavy chain only variable domain)*

VIB...*Vlaams Institute voor Biotechnologie*

V_L...*domaine variable de chaîne légère d'IgG*

VLP...*Virus-like particles*

VPg...*viral genome-linked protein*

VUB...*Vrije Universiteit Brussel*

XFP...*protéine fluorescente*

YFP...*Yellow Fluorescent Protein*

Abréviations

Pour faciliter la lecture et contrairement aux dernières recommandations de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), les espèces virales ont été abrégées par leur acronyme usuel qui n'est normalement autorisé que pour la description des souches virales.

AIMV ... <i>Alfalfa mosaic virus</i>	PEBV ... <i>Pea early-browning virus</i>
AMCV ... <i>Artichoke mottle crinckle virus</i>	PPV ... <i>Plum pox virus</i>
ArMV ... <i>Arabis mosaic virus</i>	PRSV ... <i>Papaya ringspot virus</i>
BBMV ... <i>Broad bean mottle virus</i>	PVX ... <i>Potato virus X</i>
BBYBV ... <i>Broad bean yellow band virus</i>	PVY ... <i>Potato virus Y</i>
BEV ... <i>Bovine enterovirus</i>	RABV ... <i>Rabies virus</i>
BGMV ... <i>Bean golden mosaic virus</i>	RCNMV ... <i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
BKPyV ... <i>Human BK polyomavirus</i>	RSV ... <i>Respiratory syncytial virus</i>
BMV ... <i>Brome mosaic virus</i>	SLRSV ... <i>Strawberry latent ringspot virus</i>
BNYVV ... <i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	SoMV ... <i>Sowbane mosaic virus</i>
CaMV ... <i>Cauliflower mosaic virus</i>	TBRV ... <i>Tomato blackring virus</i>
CMV ... <i>Cucumber mosaic virus</i>	TBSV ... <i>Tomato bushy stunt virus</i>
CNV ... <i>Cucumber necrosis virus</i>	TCV ... <i>Turnip crinckle virus</i>
CPMV ... <i>Cowpea mosaic virus</i>	TEV ... <i>Tobacco etch virus</i>
CpsV ... <i>Citrus psorosis virus</i>	TMEV ... <i>Theiler's encephalomyelitis virus</i>
CTV ... <i>Citrus tristeza virus</i>	TMV ... <i>Tobacco mosaic virus</i>
FMDV ... <i>Foot and mouth disease virus</i>	ToMoV ... <i>Tomato mottle virus</i>
GDefV ... <i>Grapevine deformation virus</i>	TRSV ... <i>Tobacco ringspot virus</i>
GFLV ... <i>Grapevine fanleaf virus</i>	TRV ... <i>Tobacco rattle virus</i>
HBV ... <i>Hepatitis B virus</i>	TuMV ... <i>Turnip mosaic virus</i>
HCV ... <i>Hepatitis C virus</i>	TYLCV ... <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
HIV ... <i>Human immunodeficiency virus</i>	TYMV ... <i>Turnip yellow mosaic virus</i>
HPV ... <i>Human papillomavirus</i>	WclMV ... <i>White clover mosaic virus</i>
HSV ... <i>Herpes simplex virus</i>	WMV ... <i>Watermelon mosaic virus</i>
LIYV ... <i>Lettuce infectious yellows virus</i>	WSMoV ... <i>Watermelon silver mottle virus</i>
LMV ... <i>Lettuce mosaic virus</i>	ZYMV ... <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
PCSV ... <i>Peanut chlorotic streak virus</i>	

Chapitre 1

Le Grapevine fanleaf virus

1 La maladie du court-noué de la vigne

Depuis le néolithique, l'histoire de la vigne et du vin se confond avec celle de l'humanité. La culture de la vigne est avec celle du blé une des plus anciennes cultures pratiquées par l'homme. Vraisemblablement originaire du bassin méditerranéen et du Moyen-Orient, la vigne s'est propagée au gré des conquêtes romaines dans toute l'Europe septentrionale, puis au rythme des colonisations européennes dans le reste du monde, pour être présente aujourd'hui sur l'ensemble des continents. La viticulture est donc intimement liée au développement culturel et économique des civilisations et revêt encore actuellement une importance commerciale et sociétale capitale.

Comme toutes les espèces végétales cultivées, la vigne est confrontée à des problèmes sanitaires affectant la qualité et le rendement des récoltes. En France, la filière viticole, qui n'occupe que 3,7 % de la surface agricole utile, représentait 20 % du tonnage des produits phytosanitaires utilisés en 2011 par l'agriculture (Génération Futures, 2013), que ce soit pour lutter contre les ravageurs (insectes, acariens, nématodes) ou les maladies (cryptogamiques, virales).

Parmi les vingt-deux viroses reconnues et les pseudo-viroses affectant la vigne (Martelli, 2010), la maladie du court-noué figure parmi les plus préjudiciables en raison de son incidence, de son impact économique et de l'absence de moyens de lutte satisfaisants. C'est également une des plus anciennes maladies d'origine virale connue sur *Vitis* spp (Yobrégat, 2014). Les premières descriptions de ses manifestations en Europe datent de 1841 (Cazalis-Allut & Cazalis, 1865) et des feuilles de vigne présentant des symptômes typiques de la maladie ont été retrouvées dans des herbiers provenant de collections établies il y a près de 150 ans (Martelli & Piro, 1975), avant l'invasion phylloxérique et l'introduction des porte-greffes hybrides américains.

1.1 Expression de la maladie

1.1.1 Symptômes sur la vigne

Tout comme pour de nombreuses maladies virales, les symptômes du court-noué [Encadré 1.1], qui peuvent concerner tout ou partie du cep infecté, sont variables et dépendent de la virulence de l'isolat viral, de la sensibilité du cépage touché et des conditions pédoclimatiques. Bien que généralement caractéristiques, ces symptômes peuvent néanmoins facilement se confondre avec des désordres d'ordre physiologique causés par les gelées et des carences minérales ou avec des dégâts causés par des herbicides, d'où la nécessité de recourir à des méthodes de détection classiques en virologie pour poser un diagnostic définitif.

Les symptômes foliaires apparaissent généralement au début du printemps et persistent tout au long de la période végétative mais s'estompent lors des fortes chaleurs, au cours de l'été. Ils consistent principalement en des défauts de coloration allant de mosaïques jaunissantes à des bandes chlorotiques situées autour des nervures. Ils peuvent être associés à des perturbations de la nervation et à des

Encadré 1.1 | Symptômes du court-noué sur vigne



mosaïque

Christophe RITZENTHALER



chlorose

Christophe RITZENTHALER



déformation

Christophe RITZENTHALER

Sur feuilles (*Vitis* spp.) : des déformations où les sinus pétiolaires sont élargis, les nervures principales rapprochées et le limbe asymétrique avec une indentation exagérée sont associées à des panaches chlorotiques et à des mosaïques jaunissantes, parfois comparables aux dégâts provoqués par certains herbicides.



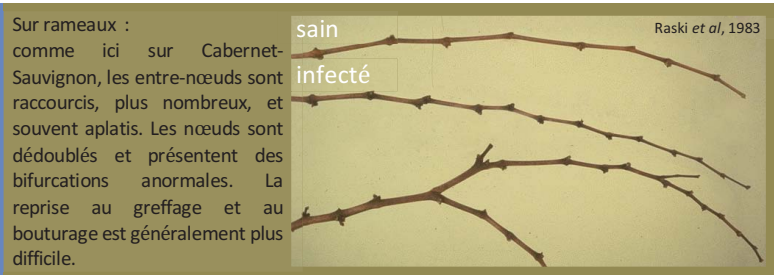
herbicide 2,4-D

<http://www.onivertre.com>



Christophe RITZENTHALER

A terme, les ceps trop affaiblis finissent par totalement dépérir mettant en péril la pérennité de vignobles à haute valeur ajoutée comme ici à Chablis.



sain
infecté

Raski et al, 1983



Olivier LEMAIRE



sain

infecté

Emmanuelle VIGNE

Sur grappes : la coulure et le millerandage ont un impact drastique sur les récoltes comme observé ici sur Gewurztraminer



Christophe RITZENTHALER

La maladie du court-noué se manifeste en foyers épidémiques isolés qui progressent en taches caractéristiques d'un jaune lumineux, facilement repérables de loin dans le vignoble au printemps.

déformations du limbe donnant à la feuille l'apparence d'un éventail ouvert d'où le nom de *fanleaf degeneration* donné à la maladie en anglais.

Le nom français de court-noué quant à lui découle directement de symptômes observés sur les rameaux. Ceux-ci présentent en effet des entre-nœuds significativement raccourcis, des ramifications anormales avec des nœuds parfois dédoublés, ainsi que des fasciations.

Après la floraison, des troubles de la fécondité des fleurs (coulure) et de la maturation des baies (millerandage) sont fréquents et confèrent à la grappe un aspect clairsemé avec des baies de différentes tailles et à différents stades de maturité.

1.1.2 Conséquences agronomiques

Les vignes infectées ont tendance à adopter un port buissonnant avec une réduction de la végétation entravant les travaux viticoles surtout quand ils sont mécanisés. La qualité des récoltes est compromise par le millerandage qui peut induire une diminution considérable de la production (plus de 80 % de perte de récolte pour certains cultivars) et qui modifie le taux de sucre et d'acidité des fruits altérant par là même les caractéristiques du vin (Andret-Link *et al*, 2004a). Dans les cas où il arrive cependant à mûrir convenablement, le raisin obtenu est parfois plus concentré en sucres et moins chargé en acides organiques. Certains exploitants faiblement affectés par la maladie prêtent alors une influence bénéfique au court-noué même si c'est au détriment de la productivité.

Au-delà des symptômes extériorisés, c'est tout le métabolisme interne (photosynthèse, processus respiratoires, activités enzymatiques, équilibres hormonaux, absorption des minéraux...) du cep infecté qui est déstabilisé (Walter, 1988) affaiblissant la plante de manière globale. Ce dépérissement progressif la rend alors plus sensible aux événements de sécheresse ou aux dommages provoqués par des périodes de grand froid, ce qui la prédispose à une mort précoce et aboutit à un arrachage anticipé des vignes des parcelles les plus atteintes.

Toutes les espèces de *Vitis* cultivées sont, à des degrés divers, sensibles à la maladie et on évalue à plus de 60 % la surface du vignoble français touchée, dont un tiers sévèrement, portant l'estimation des pertes économiques engendrées à un milliard d'euros par an (Fuchs, 2008). Au niveau mondial, pratiquement aucune région viticole n'est épargnée hormis certains vignobles américains et les vignobles récents dont la plantation s'est faite avec des plants certifiés dans des sols indemnes de vecteurs.

1.2 Etiologie

Suspectée depuis le début du XX^e siècle (Baccarini, 1902; Savastano, 1907), l'origine virale de la maladie du court-noué est clairement établie depuis les années 60 par l'identification par microscopie électronique de particules virales isolées à partir de plants de *Chenopodium amaranticolor* infectés (Cadman *et al*, 1960) et par la satisfaction aux postulats de Koch (Hewitt *et al*, 1962). Le court-noué peut être induit par différentes espèces virales [Tableau 1.1], la quasi-totalité appartenant au genre *Nepovirus*, famille des *Secoviridae* et ordre des *Picornavirales*, soit le même ordre que celui de célèbres virus animaux tels que les poliovirus responsables de la poliomyélite ou les rhinovirus responsables du rhume banal. Parmi ces népovirus, le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) est de loin le virus le plus répandu dans les vignobles infectés. En France, il est avec l'*Arabis mosaic virus* (ArMV), un népovirus sérologiquement éloigné mais apparenté au GFLV, le principal agent responsable de la maladie.

Dans la nature, le GFLV est essentiellement inféodé à la vigne, néanmoins il est occasionnellement détecté sur des plantes adventices (Horvath *et al*, 1994; Izadpanah *et al*, 2003) et peut être aisément

Virus	Acronyme	Hôtes naturels principaux	Vecteurs	Présence géographique
Nepovirus, sous-groupe A				
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	<i>Humulus, Fragaria, Prunus, Rheum, Rubus, Sambucus, Apium, Armoracia, Beta, Gladiolus, Lactuca, Vitis...</i> (<i>Arabidopsis hirsuta</i>) (Smith 1944)	<i>X. diversicaudatum</i>	Europe, Amérique du Nord, Moyen-Orient, Japon, <u>Yougoslavie</u> (Panjan 1963)
<i>Grapevine deformation virus</i>	GDefV	(<i>Vitis vinifera</i>) (Cigsar 2003)	inconnu	<u>Turquie</u> (Cigsar 2002), Iran
<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	(<i>Vitis vinifera</i>) (Cadman 1960)	<i>X. index</i>	Monde <u>France</u> (Cazalis-Allut 1865)
<i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV	<i>Rubus, Fragaria, Prunus, Ribes, Vitis...</i> (<i>Rubus idaeus</i>) (Cadman 1956)	<i>L. elongatus</i> <i>L. macrosoma</i> <i>P. maximus</i>	Europe, Asie, <u>Allemagne</u> (Bercks 1968)
<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	<i>Glycine, Nicotiana, Cucurbita, Vaccinium, Capsicum, Malus, Solanum, Vitis...</i> (<i>Nicotiana tabacum</i>) (Fromme 1927)	<i>X. americanum</i> <i>X. californicum</i> <i>X. intermedium</i> <i>X. rivesi</i> <i>X. tarjanense</i>	Amérique du Nord, Amérique du Sud, <u>États-Unis</u> (Gilmer 1970)
Nepovirus, sous-groupe B				
<i>Artichoke Italian latent virus</i>	AILV	<i>Cynara, Chicorium, Pelargonium, Gladiolus, Vitis...</i> (<i>Cynara scolymus</i>) (Majorana 1970)	<i>L. apulus</i> <i>L. fasciatus</i>	Italie, Grèce, <u>Bulgarie</u> (Jankulova 1978)
<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i>	GARSV	(<i>Vitis vinifera</i>) (Gokalp 2003)	inconnu	<u>Turquie</u> (Cigsar 2002), Iran
<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>	GCMV	<i>Apium, Vitis</i> (<i>Vitis vinifera</i>) (Martelli 1965)	inconnu	Europe de l'Est <u>Hongrie</u> (Martelli 1965)
<i>Tomato blackring virus</i>	TBRV	<i>Alium, Beta, Fragaria, Lactuca, Narcissus, Phaseolus, Rubus, Solanum, Tulipa, Vitis...</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>) (Smith 1946)	<i>L. elongatus</i> <i>L. attenuatus</i>	Europe, Canada, Turquie, Inde, Russie, Japon <u>Allemagne</u> (Stellmach 1963)
Nepovirus, sous-groupe C				
<i>Blueberry leaf mottle virus</i>	BLMoV	<i>Vitis, Vaccinium</i> (<i>Vaccinium corymbosum</i>) (Ramsdel 1979)	inconnu	Amérique du Nord, <u>Bulgarie</u> <u>États-Unis</u> (Uyemoto 1977)
<i>Cherry leafroll virus</i>	CLRV	<i>Betula, Cornus, Juglans, Ligustrum, Olea, Prunus, Ptelea, Rheum, Rubus, Sambucus, Ulmus, Vitis...</i> (<i>Juglans regia</i>) (Schuster 1933)	inconnu	Europe, Amérique du Nord, Asie, Pacifique, <u>Chili</u> (Herera 2001)
<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i>	GBLV	<i>Vitis</i> (<i>Vitis vinifera</i>) (Martelli 1977)	inconnu	Europe de l'Est, Portugal <u>Bulgarie</u> (Martelli 1977)
<i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i>	GTRSV	<i>Vitis</i> (<i>Vitis vinifera</i>) (Ouertani 1992)	inconnu	<u>Tunisie</u> (Ouertani 1992)
<i>Peach rosette mosaic virus</i>	PRMV	<i>Vitis, Prunus, Rumex, Taraxacum...</i> (<i>Prunus persica, Vitis labrusca</i>) (Catson 1933)	<i>L. diadecturus</i> <i>X. americanum</i>	Amérique du Nord, Egypte, Turquie <u>États-Unis</u> (Catson 1933)
<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV	<i>Fragaria, Malus, Nicotiana, Pelargonium, Prunus, Ribes, Rubus, Stellaria, Vitis, Taraxacum...</i> (<i>Nicotiana tabacum</i>) (Price 1936)	<i>X. americanum</i> <i>X. bricolensis</i> <i>X. californicum</i> <i>X. intermedium</i> <i>X. rivesi</i> <i>X. tarjanense</i>	Monde <u>États-Unis</u> (Hewitt 1954)
Genre non assigné				
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV	<i>Apium, Fragaria, Lilium, Prunus, Rosa, Rubus, Vitis...</i> (<i>Fragaria vesca, Rubus idaeus</i>) (Lister 1964)	<i>X. diversicaudatum</i>	Europe, Turquie <u>Allemagne</u> (Bercks 1977)

Tableau 1.1 | Seize espèces virales de la famille des *Secoviridae* sont à l'origine de la maladie du court-noué.

À l'exception du *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) qui n'est actuellement assigné à aucun genre, les virus responsables du court-noué appartiennent tous au genre *Nepovirus* dont le *Tobacco ringspot virus* (TRSV) est le représentant type. Le genre est divisé en trois sous-groupes A, B et C définis d'après les similarités de séquences et les relations sérologiques qui existent entre les différentes espèces ainsi que d'après la taille, l'organisation génomique et l'encapsidation de leur ARN2. La gamme d'hôte des népovirus peut être très large et englober de nombreuses plantes sauvages et cultivées, annuelles ou pérennes, ou au contraire être très restreinte, et est à mettre directement en regard de celle de leur vecteur associé. Les hôtes naturels majeurs, les hôtes originels échéants (entre parenthèses), les associations spécifiques avec leurs vecteurs reconnus ainsi que la répartition géographique et le pays de leur première description sur vigne (souligné) sont indiqués pour chaque espèce. (Demangeat, 2007; Martelli, 2010; 2014; EPP0; Bonants *et al*, 2013)

transmis à quelques familles d'herbacées d'intérêt expérimental (*Chenopodiaceae*, *Solanaceae*...). Sa gamme d'hôte est cependant beaucoup plus restreinte que celle des autres népovirus à l'origine du court-noué, qui à l'instar de l'ArMV ou du *Tomato blackring virus* (TBRV) peuvent se multiplier sur plusieurs cultures horticoles ou cultures arbustives à petits fruits (Oliver & Fuchs, 2011a) qui servent quelquefois de foyer primaire d'infection d'une parcelle de vigne (Laveau *et al*, 2013).

1.3 Epidémiologie

1.3.1 Transmission par nématode

De par le caractère sédentaire de leurs hôtes et du fait de la barrière physique imposée par la paroi pectocellulosique entourant la cellule végétale, la dissémination de la plupart des phytovirus repose exclusivement ou très largement sur l'intervention d'une espèce intermédiaire (insectes, acariens, nématodes, champignons...) qui sert de vecteur (Blanc, 2007).

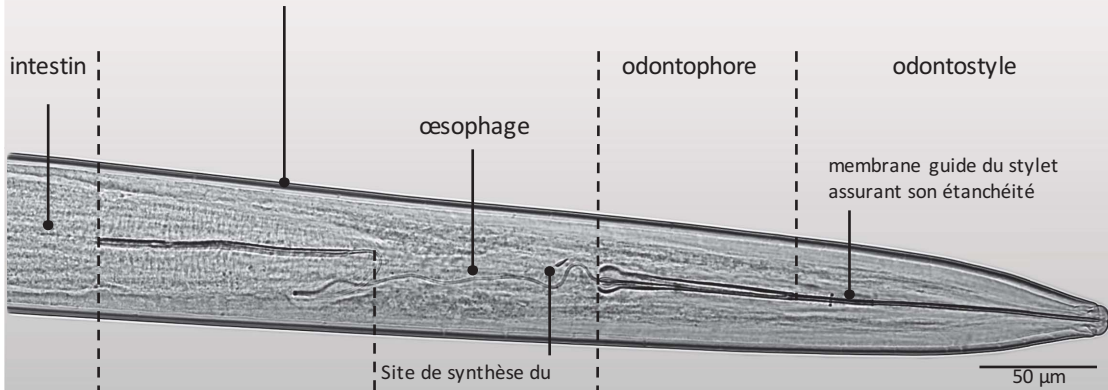
La progression de la maladie du court-noué en taches chlorotiques isolées dans les parcelles infectées [Encadré 1.1] a évoqué dès le début de son étude le concours d'un vecteur tellurique (Pantaneli, 1912; Petri, 1918). La transmission naturelle des népovirus, acronyme de **nématode transmitted polyhedral particle virus** (Cadman, 1963), est en effet pour un tiers d'entre eux assurée par des nématodes (vers microscopiques non segmentés du sol) appartenant aux genres *Longidorus*, *Paralongidorus* et *Xiphinema*, famille des *Longidoridae* et ordre des *Dorylaimidae*. Lorsque le nématode s'alimente sur les racines d'une plante infectée, les particules virales ingérées avec le contenu cytoplasmique des cellules sont adsorbées à la surface de la partie antérieure de son canal alimentaire en des sites précis différant selon le genre du vecteur (Taylor & Brown, 1997), puis sont relarguées, de plante en plante, lors de nouvelles prises alimentaires. Par analogie aux mécanismes de transmission observés chez les pucerons, on parle d'un mode de transmission non-circulant, semi-persistant ou persistant (Bragard *et al*, 2013), car le virus peut être retenu de quelques heures à plusieurs années (Demangeat *et al*, 2005) mais n'est ni internalisé ni répliqué dans le nématode et est perdu à chaque mue.

Ce rôle de vection pour des nématodes et un virus de plante a été démontré pour la première fois avec le GFLV (Hewitt & Raski, 1958) qui est transmis selon une relation mutuellement exclusive par le nématode phytophage ectoparasite *Xiphinema index* [Encadré 1.2]. L'ArMV est transmis spécifiquement par une autre espèce de nématode, *Xiphinema diversicaudatum* qui est capable de transmettre également le *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), réassigné du genre *Nepovirus* au genre *Sadwavirus* (Sanfaçon *et al*, 2009) puis récemment déclassé (King *et al*, 2012), mais appartenant toujours à la famille des *Secoviridae*. L'association étroite et sélective qui existe entre les virus et leurs vecteurs implique très certainement l'intervention d'une reconnaissance moléculaire hautement spécifique de la particule virale au niveau des sites de rétention dans le nématode. Chez *X. diversicaudatum*, la zone de rétention virale est tapissée de glucides (Robertson & Henry, 1986) qui pourraient refléter la nature biochimique du récepteur mais dont l'identité exacte n'a jusqu'à présent pu être révélée pour aucun nématode phytopathogène.

La progression d'un foyer épidémique est généralement lente car la mobilité naturelle des nématodes est limitée à quelques centimètres par an (Villate *et al*, 2008). Cependant, la dispersion des nématodes et du virus peut être accélérée par le travail du sol, la contamination des engins de labour et les eaux d'irrigation et de ruissellement qui sont susceptibles d'entraîner des nématodes virulifères sur de plus grandes distances.

Encadré 1.2 | *Xiphinema index*

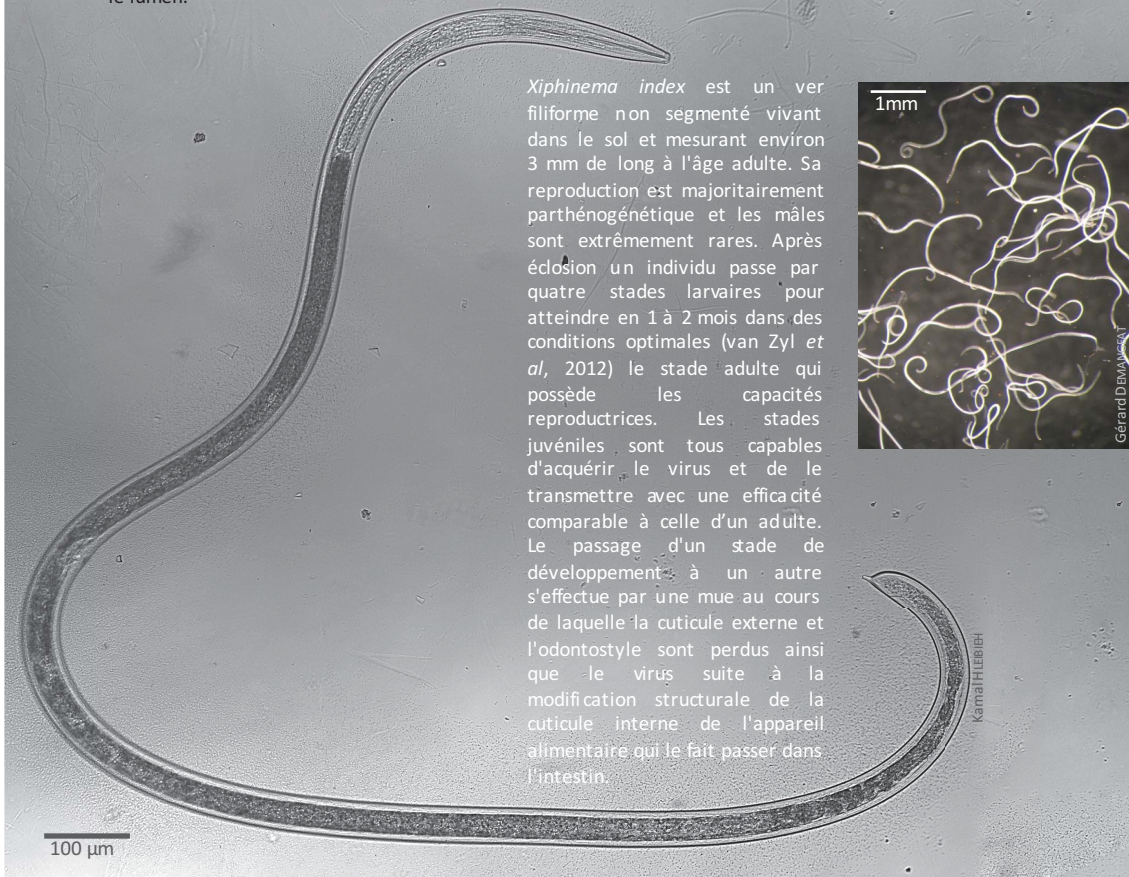
En raccourci sommaire, *Xiphinema index* peut être considéré comme un tube dans un tube. Son corps traversé de la tête à la queue par le canal alimentaire (stylet, œsophage, intestin) est recouvert d'une épaisse cuticule imperméable, constituée de kératine et de collagène, sur laquelle s'appuie un hydro-squelette sous pression qui maintient la forme du nématode et participe à sa locomotion. Elle est percée de nombreux pores qui assurent la respiration par diffusion.



Le bulbe œsophagien est un tissu musculux de structure tri-radiée qui sert de pompe aspirante et refoulante pour ingérer le contenu cellulaire et auquel sont associées les glandes salivaires dont les sécrétions se déversent dans le lumen.

Site de synthèse du stylet de remplacement

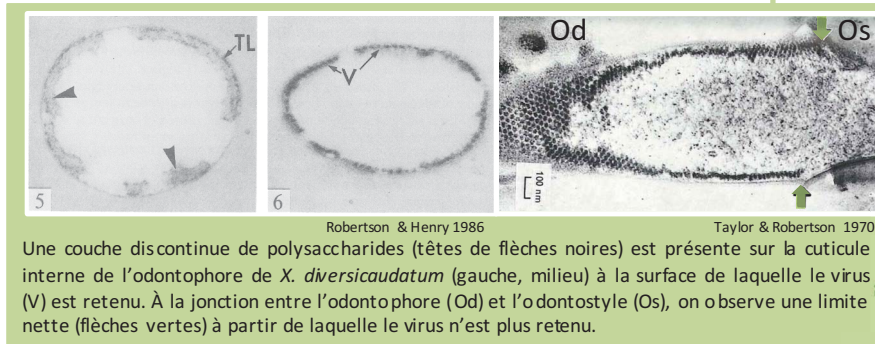
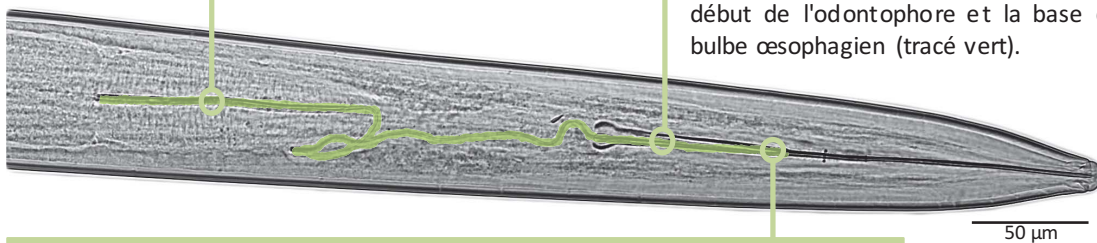
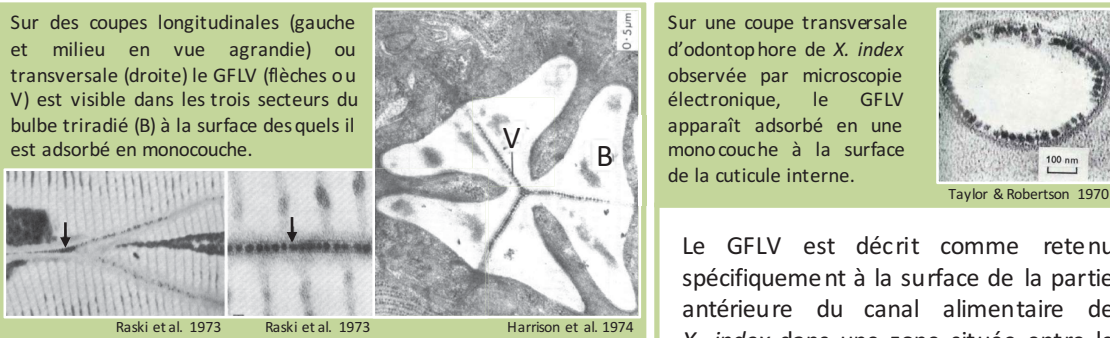
Le stylet, de 60 à 250 µm de long, est formé par un tube creux et rigide aux bords non soudés appelé odontostyle qui est relié à l'odontophore dont la partie basale est rattachée à des muscles protracteurs permettant au nématode de sortir complètement l'odontostyle pour pénétrer les cellules racinaires.



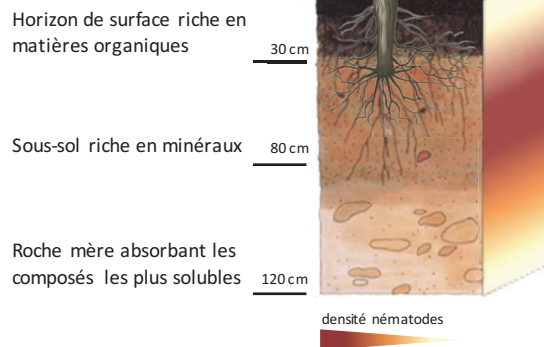
Xiphinema index est un ver filiforme non segmenté vivant dans le sol et mesurant environ 3 mm de long à l'âge adulte. Sa reproduction est majoritairement parthénogénétique et les mâles sont extrêmement rares. Après éclosion un individu passe par quatre stades larvaires pour atteindre en 1 à 2 mois dans des conditions optimales (van Zyl *et al*, 2012) le stade adulte qui possède les capacités reproductrices. Les stades juvéniles sont tous capables d'acquérir le virus et de le transmettre avec une efficacité comparable à celle d'un adulte. Le passage d'un stade de développement à un autre s'effectue par une mue au cours de laquelle la cuticule externe et l'odontostyle sont perdus ainsi que le virus suite à la modification structurale de la cuticule interne de l'appareil alimentaire qui le fait passer dans l'intestin.



Encadré 1.2 | *Xiphinema index* (suite)



Les populations de *X. index* sont réparties dans différents horizons pédologiques, la plus forte densité étant observée à 40-110 cm de profondeur (Villate *et al*, 2008) ce qui correspond à la zone où se trouvent la majorité des racines d'un cep de vigne. Dans ces horizons, les nématodes sont capables de résister à des conditions extrêmes en rentrant en phase de quiescence.



X. index s'alimente en perforant l'apex de racines en phase active de croissance avec son stylet qui lui permet d'atteindre les tissus vasculaires (gauche). Même en dehors de toute infection virale, il provoque des dommages au niveau des racines qui, lorsqu'elles sont parasitées, présentent à leurs extrémités des gonflements ou galls (milieu). Au niveau cellulaire, *X. index* induit dans ces galls la formation de cellules plurinucléées (droite).

1.3.2 Autres voies de propagation

Avant même que l'existence des virus ne soit connue, les échanges commerciaux ont probablement été la première et principale cause de dissémination de la maladie du court-noué d'un vignoble, d'un pays ou d'un continent à un autre (Yobrégat, 2014). Transmissible par greffage (Martelli, 1993), le GFLV peut être introduit sur des parcelles jusque-là indemnes de virus par implantation de greffons ou de porte-greffes infectés, voire de plants entiers avec leur rhizosphère également contaminée.

La transmission par graine a été rapportée pour de nombreux népovirus et la transmission par pollen pour un nombre plus réduit (Oliver & Fuchs, 2011a), mais du fait du caractère auto-fertile de la vigne et de son mode de propagation par multiplication végétative, ce type de dissémination de la maladie reste anecdotique dans les conditions naturelles. De même, la transmission mécanique du GFLV à la vigne, par exemple lors des opérations de taille ou par abrasion de feuille, est hautement inefficace (Valat *et al*, 2003), alors que sur hôte herbacé cette dernière est privilégiée au laboratoire pour la propagation du GFLV.

1.4 Méthodes de lutte

Il n'existe à ce jour aucune stratégie de lutte efficace contre les virus du court-noué qui soit économiquement ou écologiquement acceptable. Au contraire des maladies dites fongiques, telles que le mildiou ou l'oïdium, qu'il est possible de contrôler par des applications opportunes et judicieuses de fongicides, aucun traitement curatif du court-noué n'est disponible au vignoble et une parcelle contaminée le reste généralement de manière irrémédiable. Les seuls moyens de lutte concrets disponibles actuellement sont avant tout préventifs. Ils reposent sur l'adoption d'itinéraires techniques (Maliogka *et al*, 2015) comprenant la certification sanitaire du matériel végétal et la plantation dans des sols contrôlés exempts de nématodes (EPPO, 2009) ou dans des parcelles où la vigne n'a pas été cultivée pendant de nombreuses années.

1.4.1 Ciblant le vecteur

Les mesures prophylactiques de lutte contre le GFLV peuvent s'avérer suffisantes dans les régions à faible densité de population de nématodes, mais leur efficacité se révèle souvent vite limitée. De plus, le simple arrachage des vignes d'une parcelle ne constitue pas une solution souveraine car les nématodes, très résilients, peuvent survivre et rester virulifères jusqu'à six années après que le cep a été déraciné en s'alimentant sur des débris de racines infectées (Vuittenez *et al*, 1969; Demangeat *et al*, 2005). Autrefois, il était possible d'associer l'arrachage à une désinfection chimique des sols, notamment par fumigation de substances nématicides, mais leur utilisation a été progressivement interdite en Europe (The Council of the European Union, 2003; The Commission of the European Communities, 2007) et est maintenant totalement abandonnée au niveau mondial en raison de leur manque d'efficacité, de leur toxicité, de leur rémanence et de leur impact environnemental (Abawi & Widmer, 2000).

La stratégie la plus communément employée reste la dévitalisation des ceps par herbicide systémique après la fin des vendanges, puis extraction méticuleuse des souches pour éliminer tout fragment racinaire, potentiel réservoir du virus, le tout suivi d'une jachère. Cette mise au repos de la terre, recommandée pour une période d'au moins sept ans (Demangeat, 2007), est néanmoins difficilement compatible avec les enjeux économiques de la filière vitivinicole et des alternatives sont à l'étude pour arriver à contrôler les populations de nématodes.

Des méthodes culturales mettant à profit l'effet antagoniste de plantes vis-à-vis de *X. index* ont été validées avec la tagète (*Tagetes minuta*) et la vesce velue (*Vicia villosa*) (Villate *et al*, 2012), qui entre dans la composition d'un couvert végétal commercialisé depuis juin 2013 (VIVER Néma-contrôle, Jouffray-Drillaud), et d'autres espèces sont en cours d'évaluation. D'autres approches sont fondées sur l'identification de nouvelles molécules à effet nématocide (saponines (Pensec *et al*, 2013), fluensulfone (Oka, 2014)...) qui seraient plus respectueuses des exigences d'une viticulture durable, mais l'écart entre leur action démontrée en conditions contrôlées et leur applicabilité au vignoble est bien souvent trop important pour apporter des solutions valables sur un plan pratique. L'interdiction des nématocides a par ailleurs, pour d'autres cultures, encouragé l'étude de méthodes alternatives de lutte biologique (biofumigation, solarisation, amendements organiques sources de champignons nématophages...). Celles-ci peuvent limiter significativement les populations de certains nématodes phytopathogènes (*Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp...) (Kruger *et al*, 2013), mais elles n'ont pas d'effet probant sur la multiplication de *X. index* qui vit généralement dans des horizons du sol plus profonds qui sont très peu affectés par ces traitements.

1.4.2 Au niveau de la plante

Si actuellement il n'existe pas de traitement chimique contre les virus une fois qu'ils sont installés dans une plante, il est possible de faire appel à différentes techniques pour assainir un plant virosé (thermothérapie, mise en culture ou microgreffage de méristèmes...) (Maliogka *et al*, 2015), mais leur application n'est pas concevable à l'échelle d'une parcelle et reste restreinte à certaines variétés ou clones à haute valeur culturelle. Concernant le matériel végétal, l'essentiel des efforts dans la lutte contre le court-noué porte donc sur la production de vignes résistantes.

La prémunition, ou protection croisée, est une approche attrayante pour de nombreux exploitants car elle est assimilée à la lutte biologique et elle a permis de protéger avec succès plusieurs cultures fruitières et maraîchères (agrumes, cucurbitacées...) (Fuchs *et al*, 1997). Elle consiste à inoculer une souche virale peu agressive, ou hypovirulente, et n'ayant pas ou peu d'effets (symptômes, rendements) à des plants sains afin de les protéger d'une infection plus sévère pouvant intervenir lors d'une contamination ultérieure par une souche plus virulente du même virus. Le caractère "atténué" des souches prémunisantes se révèle cependant aléatoire (Komar *et al*, 2008) en raison de la diversité des cépages et des terroirs composant le paysage viticole ce qui en fait une technique difficile à adapter à la vigne. Elle nécessite pour sa réussite d'accumuler au préalable des données épidémiologiques et étiologiques importantes et spécifiques du terroir considéré.

L'innovation variétale par hybridation conventionnelle est utilisée depuis le début du xx^e siècle pour introduire des gènes de résistance aux agents pathogènes dans les variétés cultivées, mais c'est un processus lourd et long à mettre en œuvre et qui dépend directement de la disponibilité de sources de résistances naturelles. Or, chez *Vitis*, aucun gène de résistance naturelle au GFLV (Maliogka *et al*, 2015), ni d'ailleurs à aucun autre virus de la vigne, pour laquelle 65 espèces virales différentes ont pourtant déjà été recensées (Martelli, 2014) soit plus que pour toute autre plante cultivée, n'a été identifié à ce jour. Ceci distingue les virus des autres bioagresseurs de la vigne comme le phylloxera, le mildiou ou l'oïdium pour lesquels de nombreux gènes de résistance ont été caractérisés et intégrés à des programmes de création variétale (Merdinoglu *et al*, 2009). La recherche extensive de caractères de résistance dans la vigne a néanmoins révélé des disparités entre les différentes espèces de *Vitis* dans la capacité à être hôte pour les nématodes (Oliver & Fuchs, 2011b). Un porte-greffe développé par introgression d'une résistance à *X. index* identifiée chez l'espèce sauvage *Muscadinia rotundifolia* dans une variété cultivée

de *Vitis vinifera* a montré une aptitude à freiner la propagation du GFLV (Esmenjaud & Bouquet, 2009; Claverie *et al*, 2013). Ce porte-greffe est inscrit au catalogue officiel national des variétés autorisées depuis 2010 (Nemadex Alain Bouquet clone 1163), mais d'autres croisements sont encore nécessaires pour aboutir à la sélection d'hybrides qui présenteraient de meilleures performances agronomiques. L'étude du déterminisme génétique de la résistance à *X. index* a permis d'isoler chez *V. arizonica* le locus de caractère quantitatif (*quantitative trait locus*, QTL) *XiR1* (*X. index Resistance 1*) qui la contrôle (Hwang *et al*, 2010). Sa cartographie génétique à haute résolution a abouti au développement de marqueurs qui faciliteront et accéléreront les processus de sélection de porte-greffes résistants.

L'arrivée du génie génétique, et avec lui la possibilité d'introduire un caractère nouveau dans une espèce donnée, a offert de nouvelles perspectives pour pallier l'absence de résistance naturelle (cf Chapitre 4.1 : Biotechnologies et résistance antivirale). Dans le cas du GFLV, le concept de résistance dérivée du pathogène continue à être l'approche privilégiée mais des stratégies mettant à profit l'expression d'anticorps recombinants ont également été explorées. Jusqu'à présent, les différents essais, bien que parfois prometteurs, n'ont conduit au mieux qu'à un retard d'apparition de la maladie sur vigne.

A l'heure actuelle, le besoin d'une véritable solution pour combattre le court-noué subsiste et tout porte à croire qu'une lutte efficace et durable résultera très probablement du cumul de plusieurs stratégies. L'approfondissement des connaissances sur la biologie du virus est par ailleurs un prérequis incontournable pour identifier les points faibles du cycle viral et trouver des moyens d'action adaptés pour enrayer l'épidémie.

2 Le cycle viral du GFLV

2.1 Génome

Le GFLV étant le premier des virus affectant la vigne à avoir été transmis à des plantes herbacées, il figure parmi ceux dont la structure et l'expression du génome sont les mieux caractérisées. La souche F13 a été la première à être entièrement séquencée (Fuchs *et al*, 1989; Serghini *et al*, 1990; Ritzenthaler *et al*, 1991) et elle représente encore aujourd'hui la principale souche de référence utilisée au laboratoire. La seule connaissance de la séquence du génome d'un virus est en revanche insuffisante pour appréhender sa biologie et le groupe de Lothaire PINCK (Institut de biologie moléculaire des plantes, IBMP) s'est très tôt appliqué à créer des clones infectieux pour l'étude de la fonction des gènes viraux du GFLV. Des clones d'ADN complémentaire (*complementary DNA*, cDNA) correspondant au génome complet du GFLV-F13 ont été construits peu après son séquençage (Viry *et al*, 1993) et sont restés jusqu'à peu (Wetzel & Krczal, 2007; Wetzel *et al*, 2013) les seuls clones infectieux de népovirus mentionnés dans la littérature. Des travaux entrepris à l'Inra de Colmar ont récemment abouti à l'obtention de clones permettant la synthèse de transcrits infectieux d'une autre souche de GFLV, le GFLV-GHu (Vigne *et al*, 2013), qui se distingue de la souche F13 par sa capacité à induire des symptômes sur *Nicotiana benthamiana*. À ce jour, seuls peu de clones infectieux de virus affectant la vigne sont disponibles (Saldarelli *et al*, 2000; Jarugula *et al*, 2012; Kurth *et al*, 2012; Meng *et al*, 2013; Lovato *et al*, 2014; Zhao *et al*, 2015).

Comme tous les népovirus, le GFLV possède un génome bipartite constitué de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive protégées généralement séparément par une capsid

icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre. Les ARN sont liés de façon covalente à une petite protéine virale, la VPg (*viral genome-linked protein*), à leur extrémité 5' et présentent une séquence polyadénylée à leur extrémité 3'. Chaque ARN est monocistronique et est traduit en une seule polyprotéine dont le clivage protéolytique, assuré par la protéase virale (Margis *et al*, 1991; 1993b; 1993a), libère les différentes protéines fonctionnelles nécessaires au déroulement du cycle viral [Encadré 1.3].

L'ARN1 (7342 nt pour la souche F13) code pour la polyprotéine P1 (253 kDa pour la souche F13) qui est maturée en *cis* par son propre domaine protéase en cinq protéines : 1A (de fonction inconnue), 1B^{Hel} (contenant un motif de type hélicase), 1C^{VPg}, 1D^{Pro} (la protéase) et 1E^{Pol} (contenant un motif de type ARN polymérase ARN-dépendante). Les fonctions portées par ces protéines sont suffisantes à la réplication de l'ARN1, qui est capable de se répliquer de façon autonome en protoplastes, et sont requises pour assurer la réplication de l'ARN2 (Viry *et al*, 1993). L'ARN2 (3774 nt pour la souche F13) code pour la polyprotéine P2 (122 kDa pour la souche F13) qui est maturée en *trans* en trois protéines : 2A^{HP} (qualifiée de "*homing protein*" car sa séquence codante est nécessaire à la réplication de l'ARN2 et que plusieurs éléments suggèrent qu'elle dirige ce dernier vers le site de sa réplication dans la cellule (Gaire *et al*, 1999; Ritzenthaler *et al*, 2002), 2B^{MP} (la protéine de mouvement) et 2C^{CP} (la protéine de capsid). La présence simultanée des ARN1 et 2 est nécessaire au déclenchement d'une infection systémique en plante. Certains isolats comme la souche F13 comportent parfois un ARN3 (1114 nt) de type ARN satellite dont le cadre ouvert de lecture (*open reading frame*, ORF) code pour une seule protéine (P3) indispensable à sa réplication (Pinck *et al*, 1988; Fuchs *et al*, 1989; Gottula *et al*, 2013).

En amont et en aval de sa région codante, chaque ARN comprend également des régions non traduites (*untranslated regions*, UTR) d'environ 250 nucléotides de long. Dans le cas de l'ARN satellite, il a été prouvé qu'elles conditionnent sa réplication (Hans *et al*, 1993). La conservation d'une courte séquence nucléotidique et de motifs structuraux en tige-boucle, prédits dans les 5'UTR des ARN génomiques de plusieurs variants du GFLV (Mekuria *et al*, 2009), suggérerait également leur rôle dans la réplication, mais celui-ci n'a jamais été confirmé expérimentalement.

2.2 Réplication

Le cycle de réplication du GFLV est décrit comme intégralement cytoplasmique et s'effectue au sein de compartiments viraux qui forment des complexes de réplication denses, généralement situés en périphérie du noyau (Ritzenthaler *et al*, 2002). Ils résultent de la prolifération de membranes nouvellement induites et dérivées du réticulum endoplasmique qui s'amassent en vésicules, parfois regroupées en rosette caractéristique rappelant ce qui peut être observé dans des cellules animales infectées par certains picornavirus comme le poliovirus ou le *Bovine enterovirus* (BEV) [Figure 1.1] (Bienz *et al*, 1992; Monaghan, 2004).

Dans cet environnement protégé de processus concurrents ou de défense de l'hôte, le génome viral sert à la fois de messenger pour la synthèse directe des polyprotéines virales par la machinerie traductionnelle cellulaire et de matrice pour sa propre réplication par la 1E^{Pol} [Encadré 1.4]. Cette dernière génère des structures d'ARN double-brin constituant les formes répliquatives du virus qui s'accumulent dans les complexes de réplication auprès desquels se concentrent également l'ensemble des protéines virales non structurales codées par l'ARN1, ainsi que les protéines 2A^{HP} et 2C^{CP} (Gaire *et al*, 1999; Ritzenthaler *et al*, 2002).

L'absence de fonction correctrice associée à la 1E^{Pol} rend le processus de réplication propice à l'apparition de mutations qui, combinées aux événements de recombinaison intra- et inter-espèces

Encadré 1.3 | Génome du GFLV

EGFP:1A François BERTHOLD
5 µm

EGFP:1A noyau

EGFP:1A + 2A:TagRFP

EGFP:1A

EGFP:1A + 2A:TagRFP

EGFP:1B Corinne KEICHLINGER
5 µm

anti-VPg/Alexa488 Ritzenhaller et al., 2002
5 µm

noyau

anti-EGFP Vigne et al., 2013
EGFP:2B
EGFP
-1D^{pro} + 1D^{pro}

N. benthamiana GFLV-GHU
GFLV-F13 Vigne et al., 2013

Protéine possédant des domaines membranaires et contenant un motif NTB (nucleoside triphosphate - binding sequence) conservé, elle a une fonction partiellement redistribuée dans le cytoplasme en présence de 2A.

Protéine intrinsèquement désordonnée chez les phytovirus, la VPg du GFLV est reliée par liaison phosphodiester entre une sérine et le résidu uridine 5'-terminal de l'ARN viral (Jiang et al., 2011). Elle est présente dans les complexes de réplication.

Protéase à cystéine, son activité a été démontrée *in vitro* et *in vivo* (Vigne et al., 2013). La combinaison VPg/1D^{pro} est plus efficace pour le clivage de l'ARN1.

Identifiée par analogie de séquence comme polymérase (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp). Elle détermine les symptômes du GFLV dans certains hôtes herbacés.

Le génome du GFLV est composé de deux ARN linéaires simple brin positifs reliés chacun à une VPg et à une queue poly-A. Les régions codantes dont l'organisation est commune à tous les *Nepovirus* sont représentées par des rectangles. Elles sont traduites en 2 polyprotéines P1 (253kDa) et P2 (122kDa) clivées par la protéase 1D^{pro} aux sites indiqués par des traits noirs verticaux pour former les 8 protéines fonctionnelles.

Le domaine 2A^{HP} de la P2 est nécessaire à la réplication de l'ARN2, probablement en ancrant ce dernier ou sa polyprotéine dans des membranes recrutées par les complexes de réplication. En expression transitoire dans *N. benthamiana*, elle forme des corps cytoplasmiques. Des études phylogénétiques la décrivent déterminant de la symptomatologie sur vigne (Elbeaino et al., 2014).

Protéine capable de s'autoassembler en tubules même hors contexte viral et fusionnée à une protéine fluorescente. Elle permet le passage du virus d'une cellule à une autre probablement en interaction directe avec la capsid du GFLV.

60 copies de 2C^{CP}, unique protéine structurale du GFLV, forment la capsid icosaédrique. Un immuno-marquage sur protoplastes de cellules BY2 infectées la révèle présente dans les complexes de réplication péri-nucléaires (flèches blanches) du virus. Chez le TORSV, elle est décrite comme ayant une activité de suppression de silencing, ce qui n'a pas été démontré chez le GFLV.

CP x60
x12
Swiss Institute of Bioinformatics

anti-CP/Alexa568 Ritzenhaller et al., 2002
5 µm

noyau

EGFP:2B Amar et al., 2010
20 µm

MP

2A:TagRFP François BERTHOLD
5 µm

noyau

EGFP:1A + 2A:TRFP

(Vigne *et al*, 2004; Mekuria *et al*, 2009), participent à l'évolution du virus. Cette variabilité génétique est d'autant plus favorisée dans le cas du GFLV qu'il s'agit d'un virus qui affecte la vigne, une plante pérenne donc susceptible d'être infectée sur de longues périodes. Un isolat de GFLV, comme tout virus, ne consiste pas en une population homogène constituée par un élément unique avec des séquences génomiques identiques mais se compose d'un ensemble de variants génétiquement proches formant une "quasi-espèce" (Naraghi-Arani *et al*, 2001). Le GFLV comporte une diversité de variants moléculaires, d'origines géographiques diverses, qui sont documentés sur des portions plus ou moins amples du génome (Terlizzi *et al*, 2014; Zarghani *et al*, 2013; Palomares Rius *et al*, 2012; Eichmeier *et al*, 2011; Oliver *et al*, 2010; Mekuria *et al*, 2009; Liebenberg *et al*, 2009; Vigne *et al*, 2008; Pompe-Novak *et al*, 2007; Vigne *et al*, 2004; Naraghi-Arani *et al*, 2001). Globalement, la plus forte pression de sélection est exercée sur la 2C^{CP} et la 2B^{MP} (Oliver *et al*, 2010; Sokhandan-Bashir & Melcher, 2012), probablement en raison de leur rôle dans les étapes clés de transmission et de mouvement, et la plus faible contrainte est observée sur la 2A^{HP} dont le degré de divergence nucléotidique peut atteindre 41 % entre différents isolats (Elbeaino *et al*, 2014). Cette variabilité peut être reliée à la forte propension de la région 5'-proximale de l'ARN2 du GFLV à recombiner. L'ensemble des études montrent que les recombinaisons affectant le GFLV sont généralement intraspécifiques mais elles peuvent aussi être interspécifiques, en particulier avec l'ArMV. La relation intime existant entre le GFLV et l'ArMV est ainsi soupçonnée d'avoir contribué à l'émergence de nouvelles souches, comme le GFLV-GHu qui résulte d'une recombinaison dans le 5'UTR, la 2A^{HP} et la 2B^{MP} (Vigne *et al*, 2008), voire d'être à l'origine de nouvelles espèces taxonomiquement distinctes comme le *Grapevine deformation virus* (GDefV) qui résulte d'une recombinaison, plus rarement observée, dans la 2C^{CP} (Elbeaino *et al*, 2012).

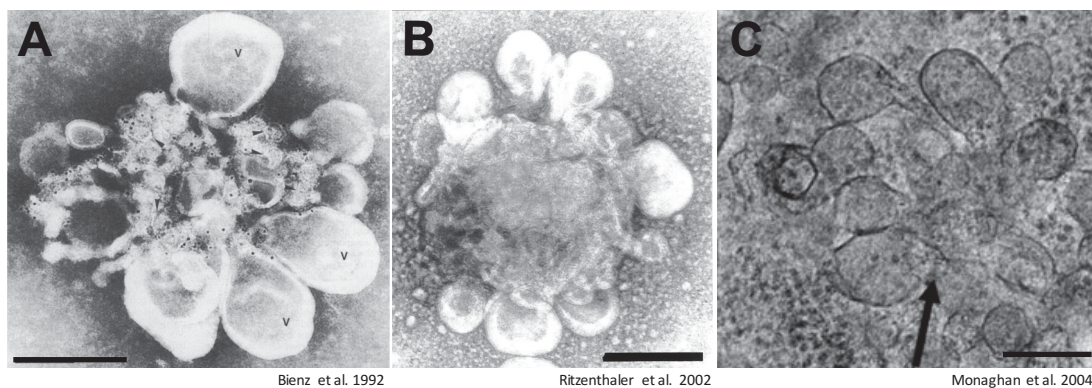
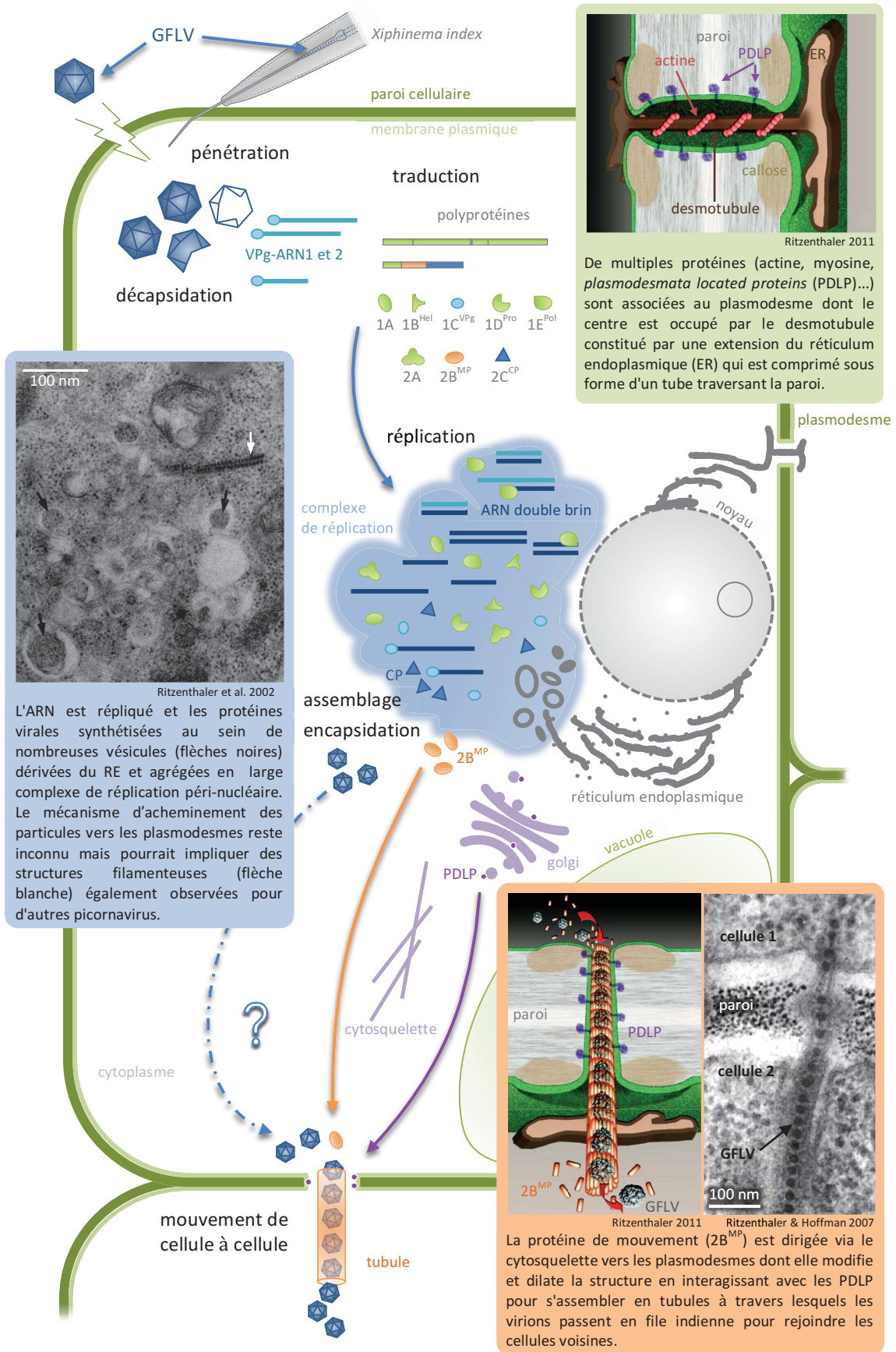


Figure 1.1 | Comparaison ultra-structurale des sites de réplication du poliovirus, du GFLV et du *Bovine enterovirus* (BEV) observés par microscopie électronique.

Le poliovirus (A), le GFLV (B) et le BEV (C) se répliquent dans l'espace péri-nucléaire au sein de nombreuses vésicules membranaires, dérivées du réticulum endoplasmique de la cellule hôte, de taille hétérogène et parfois rassemblées en rosette.

A. Immuno-microscopie électronique en coloration négative d'un extrait brut de cellules Hep-2 infectées par le poliovirus type 1 (PV1, souche Mahoney), après centrifugation sur gradient de saccharose et immunomarquage à l'or colloïdal de la protéine virale 2C nécessaire à la réplication. La lettre V indique les vésicules induites par le virus et les flèches un système membranaire plus compact observé au centre de la rosette (Bienz *et al*, 1992). **B.** Immuno-microscopie électronique en coloration négative d'un extrait brut fixé de protoplastes de cellules de tabac BY2 infectés par le GFLV, après gradient de saccharose et immunocapture avec un anticorps polyclonal anti-VPg, (Ritzenthaler *et al*, 2002). **C.** Microscopie électronique en coloration négative de cellules BHK-38 infectées par le BEV, après congélation à haute pression (*high pressure freezing*, HPF). La flèche indique un regroupement de vésicules en rosette (Monaghan *et al*, 2004). Barres d'échelle : 200 nm.

Encadré 1.4 | Cycle cellulaire du GFLV



Au-delà du rôle immédiat de la $1E^{Pol}$ dans la réplication, on a récemment constaté que sa région 3'-terminale située en aval de son domaine polymérase canonique détermine les symptômes induits par le GFLV-GHu sur *N. benthamiana* et *N. clevelandii* [Figure 1.2] (Vigne *et al*, 2013). Cette région n'est pas clivée post-traductionnellement et sa fonction dans la symptomatologie est indépendante du titre viral. Les études actuelles n'ont pas encore permis de savoir si cette fonction est due à l'expression de la protéine ou si elle est purement liée à la structure primaire de l'ARN.

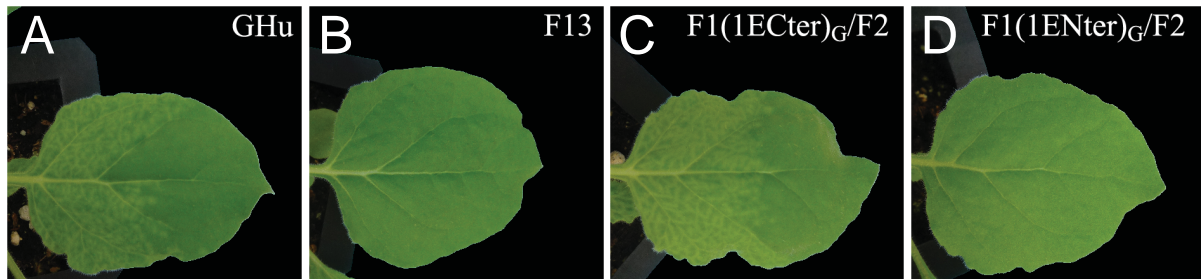
Vigne *et al.* 2013

Figure 1.2 | Comparaison des symptômes observés sur feuilles systémiques de *N. benthamiana* 6 à 12 jours après inoculation de différentes souches de GFLV (Vigne *et al*, 2013).

Sur *N. benthamiana*, une infection par le GFLV-GHu induit l'apparition d'une mosaïque foliaire de couleur jaune pâle (A) tandis qu'une infection par le GFLV-F13 reste complètement asymptomatique (B). La différence de phénotype provoqué par des clones infectieux chimériques exprimant soit la partie C-terminale (C) soit la partie N-terminale (D) de la protéine $1E^{Pol}$ d'origine GHu dans un contexte génétique F13 a permis d'identifier l'extrémité 3' de la région codante de la polymérase de la souche GHu comme déterminant de la symptomatologie du GFLV sur *N. benthamiana*.

2.3 Mouvement

L'ARN2 code pour les fonctions d'encapsidation et de mouvement, toutes deux essentielles à la propagation du virus dans la plante. Le GFLV transite de cellule en cellule sous forme de virions par la voie symplastique via des structures tubulaires, dénommées tubules, qui traversent la paroi pectocellulosique [Encadré 1.4]. Les tubules résultent d'un auto-assemblage de la $2B^{MP}$, seule protéine virale requise pour leur constitution (Ritzenthaler *et al*, 1995; Laporte *et al*, 2003), au niveau des plasmodesmes qui relient le cytoplasme des cellules végétales contiguës et assurent les communications intercellulaires. L'architecture du plasmodesme se retrouve complètement bouleversée par la présence du tubule qui en élargit considérablement le lumen pour permettre le passage des particules virales dont la taille excède normalement sa taille limite d'exclusion (*size exclusion limit*, SEL). Ce profond remodelage consiste notamment en la disparition en son centre du desmotubule, un tube membranaire dense dérivé du réticulum endoplasmique, qui est remplacé par le tubule dont la structure reste stable et persiste au cours de l'infection, comme c'est également le cas pour le *Cowpea mosaic virus* (CPMV), (Pouwels *et al*, 2003). La formation du tubule est orientée, l'addition de nouvelles molécules de $2B^{MP}$ s'effectuant au niveau de la membrane de la cellule infectée à la base du tubule (Hofmann, 2007) qui ressort protubérant dans le cytoplasme des cellules voisines (Ritzenthaler & Hofmann, 2007).

L'adressage de la $2B^{MP}$ au niveau des plasmodesmes est un processus relativement bien décrit qui utilise les voies de sécrétion et le cytosquelette (Laporte *et al*, 2003; Schoelz *et al*, 2011). Il nécessite l'intervention d'une famille de protéines cellulaires résidentes des plasmodesmes, les *plasmodesmata located proteins* (PDLP) (Thomas *et al*, 2008), qui sont conservées chez les végétaux supérieurs et qui serviraient de récepteurs pour l'ancrage de la $2B^{MP}$ et l'induction de son assemblage en tubule (Amari *et al*, 2010). La $2B^{MP}$ serait acheminée du compartiment viral vers la périphérie cellulaire par diffusion ou

en association avec les microtubules tandis que le transport des PDLP est dépendant du système de sécrétion et des myosines de type XI (Amari *et al*, 2011). Des plasmodesmes intacts ne sont cependant pas indispensables à la constitution des tubules qui sont facilement formés dans des protoplastes (cellules végétales isolées et débarrassées de leur paroi par traitement enzymatique) où ils apparaissent dirigés vers le milieu de culture enveloppés par la membrane plasmique.

Le mécanisme de transport intra- et inter-cellulaire de la particule virale reste quant à lui à déterminer, en particulier, le site de rencontre entre la 2B^{MP} et les virions est inconnu. Ces derniers pourraient être cotransportés vers la membrane avec la protéine de mouvement (van Lent & Schmitt-Keichinger, 2006) ou au contraire suivre une route 2B^{MP} indépendante, celle-ci étant détectée presque exclusivement dans les tubules (Ritzenthaler *et al*, 2002). La détection occasionnelle, par immunomarquage dirigé contre la 2C^{CP}, ou en microscopie électronique, de particules virales organisées en rangées para-cristalline fibreuses (Savino *et al*, 1985; Ritzenthaler *et al*, 2002) pourrait par ailleurs suggérer une participation de structures filamenteuses dans le transport des virions à l'instar de la participation des filaments intermédiaires démontrée pour le *Theiler's encephalomyelitis virus* (TMEV), un autre virus de l'ordre des *Picornavirales*. Le passage des particules virales à l'intérieur du tubule sur le principe de la vis sans fin par polymérisation et dépolymérisation de la 2B^{MP} aux extrémités est le scénario le plus vraisemblable pour le franchissement des plasmodesmes (Ritzenthaler, 2011). Ce mécanisme et la structure compacte des tubules impliquent des interactions directes ou indirectes fortes au sein des tubules entre les virions et la 2B^{MP}. Par analogie avec d'autres virus tel que le CPMV, l'extrémité C-terminale de la 2B^{MP} intervient probablement dans cette interaction. La confirmation génétique du rôle de cette extrémité de la 2B^{MP} a été apportée par l'étude du mouvement de virus recombinants chimères entre le GFLV et l'ArMV qui est aboli dès lors que les neuf derniers acides aminés de la 2B^{MP} ne sont pas de la même origine que la 2C^{CP} (Belin *et al*, 1999).

Le manque d'outils demeure le principal frein à une élucidation plus poussée du mécanisme moléculaire assurant le mouvement du GFLV. L'idéal serait de disposer de tubules et/ou de particules fluorescentes pour pouvoir visualiser en temps réel la dynamique des tubules. L'expression transitoire de 2B^{MP}, libre ou fusionnée en N-terminal à une protéine fluorescente, conduit à la formation de tubules similaires à ceux observés au cours d'une infection (excepté l'absence de virions), mais la fusion en supprime la fonctionnalité.

2.4 Transmission

L'absence d'outils, tels qu'un système d'acquisition artificielle du virus par le nématode ou la capacité de visualiser facilement les particules retenues, a limité de la même façon la parfaite compréhension du mécanisme de la vexion du GFLV. Le GFLV constitue le premier exemple décrit de transmission d'un phytovirus par nématodes (Hewitt & Raski, 1958) et pourtant, plus d'un demi-siècle plus tard, on ne connaît pas la nature biochimique de son récepteur potentiel au niveau de *X. index*. On ne connaît pas non plus avec une certitude absolue les protéines virales et/ou les facteurs de l'hôte qui pourraient être impliquées. Grâce à l'exploitation de l'exclusivité de transmission du GFLV par *X. index* et de l'ArMV par *X. diversicaudatum*, qui en fait un modèle expérimental unique, les connaissances se rapportant à la spécificité de la transmission sont en revanche très avancées.

L'apport de la biologie moléculaire et le développement de transcrits infectieux du GFLV a rendu possible des expériences de génétique inverse où des séquences de l'ARN2 du GFLV ont été échangées avec leurs équivalents de l'ArMV et vice versa. L'analyse de la transmissibilité des chimères obtenues a

ainsi établi que l'ARN2 (Belin *et al*, 2001) et plus précisément la 2C^{CP} (Andret-Link *et al*, 2004b; Marmonier *et al*, 2010) constitue le seul déterminant viral de la spécificité de transmission du GFLV et de l'ArMV [Figure 1.3]. La modélisation 3D du GFLV à partir de la structure atomique du TRSV (Schellenberger *et al*, 2010) a permis de partager la 2C^{CP} en plusieurs régions exposées en surface de la capsid pour cibler des mutations de résidus conservés parmi les souches de GFLV publiées mais divergents entre GFLV et ArMV. Ainsi, deux motifs protéiques conditionnant la transmission du GFLV par *X. index* ont été plus précisément identifiés (Schellenberger *et al*, 2010; 2011). L'un des motifs correspond à une région formée par onze résidus consécutifs (Phe₁₈₈-Arg₁₉₈) dont la substitution avec la séquence homologue de l'ArMV a conduit à l'obtention d'un mutant (GFLV-G2) non transmis par *X. index* (Schellenberger *et al*, 2010). L'autre motif est remarquablement restreint au seul résidu Gly₂₉₇ dont la mutation en aspartate trouvée de manière fortuite chez un variant naturel du GFLV (GFLV-TD) est suffisante pour réduire significativement la transmission de ce dernier par *X. index* (Schellenberger *et al*, 2011).

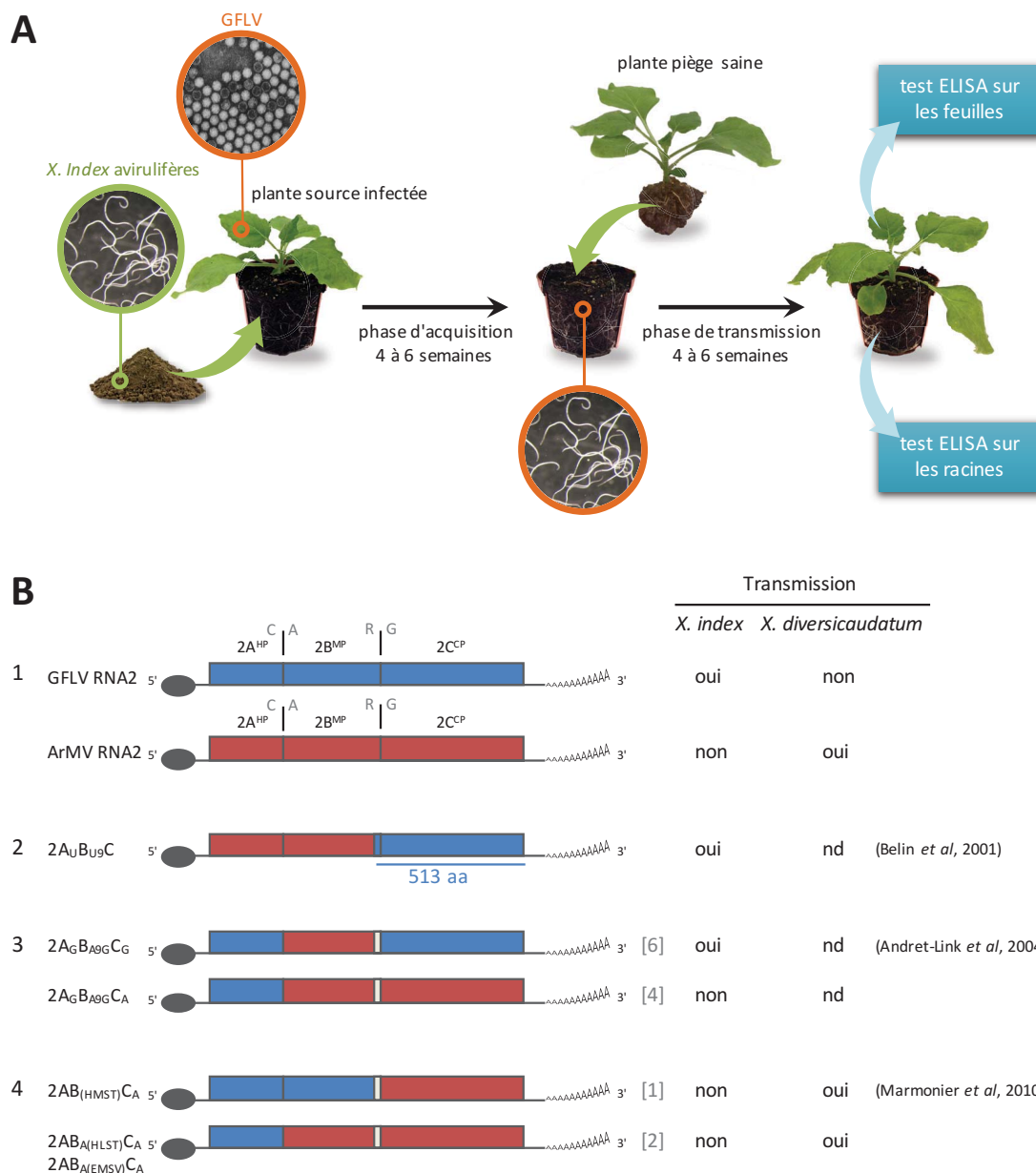


Figure 1.3 | Récapitulatif des études ayant démontré la détermination de la spécificité de transmission du GFLV par *X. index* et de l'ArMV par *X. diversicaudatum*.

Figure 1.3 | Récapitulatif des études ayant démontré la détermination de la spécificité de transmission du GFLV par *X. index* et de l'ArMV par *X. diversicaudatum*.

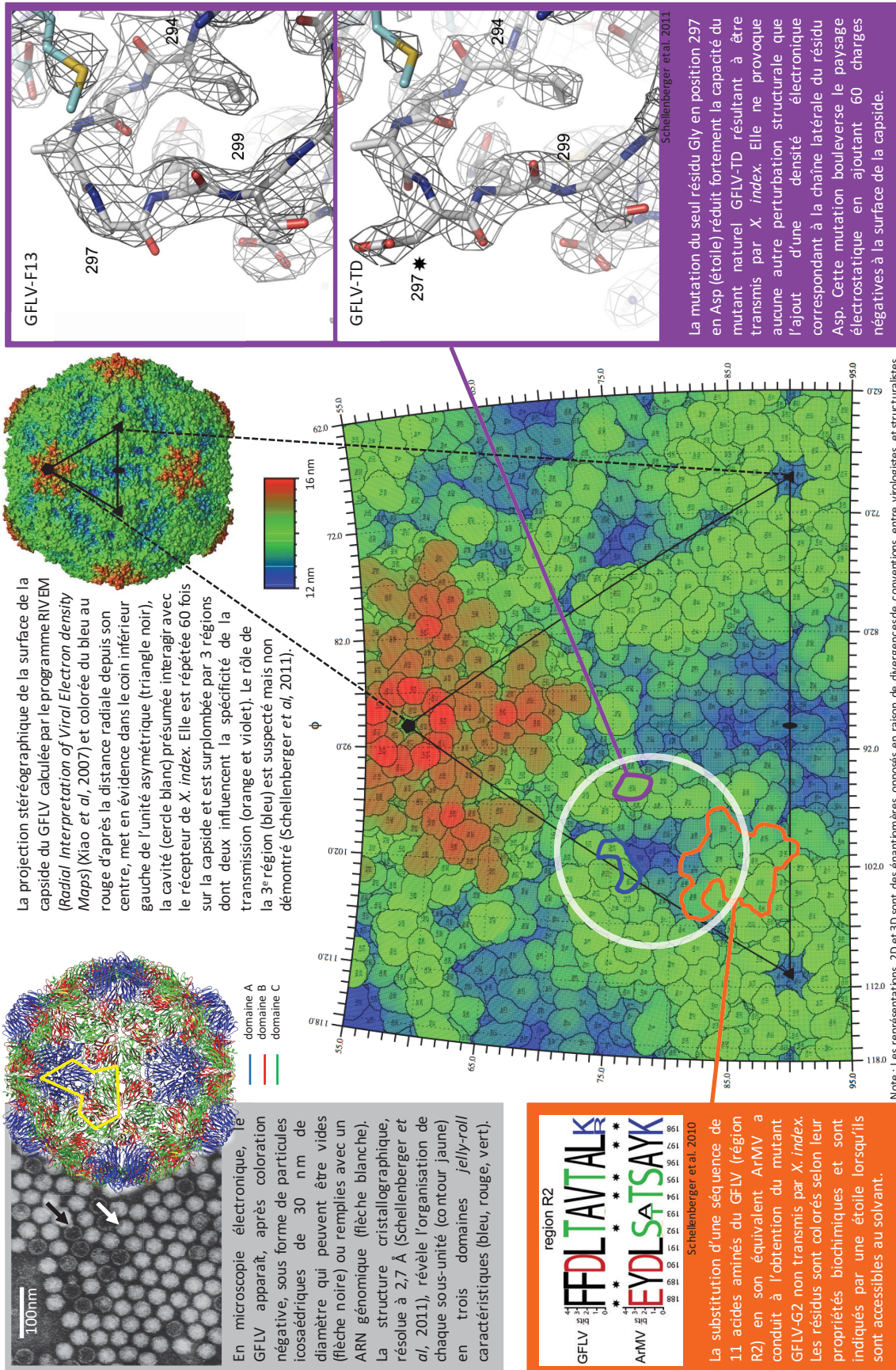
A. Le test de transmission a évolué au fil des études d'un test de vigne, inoculée par hétérogreffage, à vigne à un test de plante herbacée, inoculée mécaniquement, à plante herbacée. Une plante saine est inoculée et cultivée dans un sol contenant des nématodes avirulifères. Au terme de cette étape d'acquisition la plante source est remplacée par une plante piège saine pour l'étape de transmission, à la fin de laquelle la présence du virus est recherché par ELISA au niveau des racines et des feuilles. **B.** Schéma des ARN2 du GFLV (en bleu) et de l'ArMV (en rouge) (1) et des échanges de séquences codantes de l'ARN2 du GFLV par leurs équivalents ArMV qui ont permis de démontrer que la spécificité de transmission est liée à la séquence codant pour la 2C^{CP} (2 à 4). La spécificité de transmission a d'abord été réduite à la séquence codant pour les 513 derniers acides aminés de la polyprotéine P2 (2). Des mutations ponctuelles ont ensuite été introduites en fin de 2B^{MP} (rectangle blanc) pour obtenir des constructions infectieuses (dont le nombre apparaît entre crochets) portant la séquence de la 2C^{CP} du GFLV ou de l'ArMV (3) et montrant que seule la 2C^{CP} du GFLV détermine la transmission spécifique par *X. index*. Enfin, l'obtention d'un élevage de *X. diversicaudatum* et de constructions infectieuses (nombre noté entre crochets) portant la 2B^{MP} et/ou la 2C^{CP} de l'ArMV (4) a permis de conclure que la 2C^{CP} de l'ArMV détermine la transmission spécifique par *X. diversicaudatum*.

Par la suite, la structure atomique du GFLV-F13 a été obtenue, par cristallographie et cryomicroscopie électronique, à une résolution de 3,0 Å (Schellenberger *et al*, 2011) [Encadré 1.5]. Elle est définie par un arrangement de 60 copies de 2C^{CP} selon une symétrie icosaédrique pseudo $T = 3$ (Prasad & Schmid, 2012). La 2C^{CP} est l'unique protéine structurale du GFLV, elle est capable de s'auto-assembler en l'absence d'ARN et est organisée en trois domaines β -barrel similaires adoptant chacun un repliement de type *jelly-roll*, caractéristiques des *Picornavirales* (Chandrasekar & Johnson, 1998). La combinaison des approches structurale et de génétique inverse a permis de situer ces deux motifs critiques pour la spécificité de transmission aux bords d'une cavité chargée positivement. On peut imaginer que ce ne sont pas ces acides aminés en eux-mêmes qui sont importants, mais toute la poche qu'ils surplombent qui serait susceptible de déterminer la spécificité de vection et de constituer le site de liaison au potentiel récepteur chez le nématode. Des mutations peuvent altérer la transmission pour différentes raisons, la rupture d'un contact direct avec le nématode étant l'effet immédiat le plus évident, mais des effets plus indirects tels la modification de la conformation ou de la charge de la capsidie conduisant à une inhibition de la rétention dans le nématode ou du relargage dans la cellule sont également envisageables (Mayo *et al*, 1994).

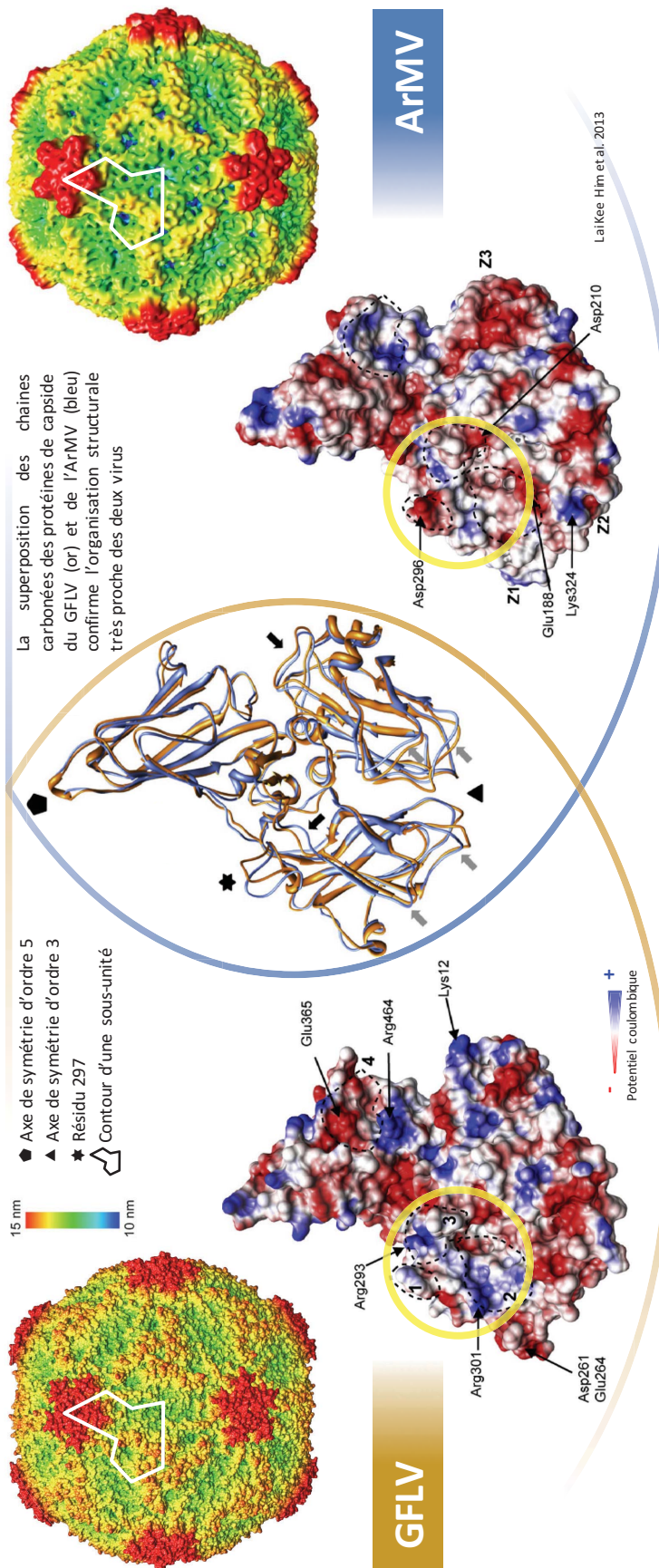
Dans le cas du GFLV-TD, la structure cristallographique obtenue à une résolution de 2,7 Å a montré qu'il ne diffère significativement du GFLV-F13 que par la protubérance apportée par la chaîne latérale d'un acide aspartique résultant de la mutation Gly₂₉₇Asp [Encadré 1.5]. Par contre, cette substitution ajoute une charge négative à la 2C^{CP} aux abords de la cavité qui est seule à présenter un potentiel de surface positif dans un environnement globalement chargé négativement. Le fort impact de cette charge, répétée 60 fois à l'échelle de la capsidie, alors que la mutation neutre Gly₂₉₇Ala n'a pas d'incidence, suggère l'importance du paysage électrostatique dans la spécificité de transmission du GFLV. Cette hypothèse est renforcée par l'obtention récente par cryomicroscopie électronique de la structure de l'ArMV-S à une résolution de 6,5 Å (Lai-Kee-Him *et al*, 2013). Sa comparaison avec celle du GFLV a en effet mis en évidence des disparités notables de la répartition des charges au niveau de la cavité [Encadré 1.5].

L'analogie d'organisation structurale de cette région avec la structure résolue du *Foot and mouth disease virus* (FMDV) complexé avec l'héparane sulfate, un oligosaccharide correspondant à un de ses récepteurs cellulaires, semble aller dans le même sens et pourrait refléter une possible nature biochimique similaire du récepteur du GFLV présent sur le canal alimentaire de *X. index*.

Encadré 1.5 | Déterminants de la spécificité de transmission du GFLV

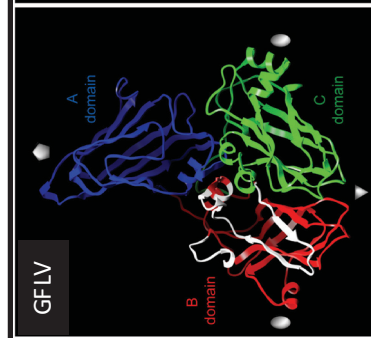


Encadré 1.5 | Déterminants de la spécificité de transmission du GFLV (suite)



Lai Kee Him et al. 2013

La comparaison structurale entre la cavité suspectée d'interagir avec le récepteur chez *X. index* et le motif de reconnaissance par le *Foot and mouth disease virus* (FMDV) de l'héparane sulfate (un de ses récepteurs cellulaires) souligne les similitudes entre les deux capsides et pourrait refléter la nature du récepteur du GFLV au niveau de son vecteur.



L'obtention récente de la structure de l'ArMV à une résolution de 6,5 Å (Lai Kee Him et al, 2013) permet entre autres de comparer les paysages électrostatiques des protéines de capside du GFLV et de l'ArMV. Ils diffèrent notamment au niveau de la cavité, site potentiel d'interaction du virus avec le récepteur de *X. index*, matérialisée par un cercle jaune. Chargée positivement chez le GFLV, son potentiel coulombique est inverse chez l'ArMV. Ces différences structurales pourraient refléter l'importance des charges dans la spécificité de transmission des deux virus.

L'échange des deux motifs impliqués dans la transmission du GFLV par *X. index* par leurs analogues ArMV n'a cependant jamais abouti à un changement de la spécificité de vection c'est-à-dire à un gain de transmission par *X. diversicaudatum*. Cela dénote l'extrême sophistication des capsides icosaédriques dont la modification, même minime et n'affectant que peu l'architecture globale, peut perturber drastiquement la fonction. L'utilisation du couple ArMV/GFLV, bien que constituant un modèle de choix pour l'étude de la spécificité de transmission, est limitée par la compatibilité structurale des deux capsides combinées. Les échanges de régions qui perturbent la fonctionnalité de la capsidite dans les étapes antérieures à la transmission aboutissent à une impasse et ne permettent pas de déterminer l'implication de ces régions dans la transmission. En s'attachant à restaurer l'équilibre conformationnel d'un tel mutant, auparavant létal, l'équipe Virologie-Vection à l'Inra de Colmar a tout récemment contourné cette limite par le rétablissement des contacts entre sous-unités et un changement de spécificité de transmission semble avoir été obtenu pour la première fois (Belval *et al*, 2015). Les retournements de spécificité virale sont un domaine encore mal caractérisé, même dans le monde animal, et particulièrement pour les virus à récepteurs glucidiques. Toutefois, l'analyse structurale de la mutation d'un seul acide aminé central pour la détermination de la spécificité du *Human BK polyomavirus* (BKPyV), dont l'attachement cellulaire est médié par l'acide sialique, a permis le déchiffrement du changement de tropisme du virus (Neu *et al*, 2012). Cette nouvelle approche de mutagenèse dirigée, moins déstabilisante et plus conservatrice de l'architecture structurale de la capsidite, ouvre ainsi la voie à la compréhension du mécanisme de transmission du GFLV et de l'ArMV et à l'identification de leurs récepteurs réciproques. Le GFLV pourrait ainsi continuer sur sa lancée et avoir à nouveau la primeur, cette fois dans la course encore ouverte de la première élucidation d'un récepteur de virus de plantes chez un vecteur.

Chapitre 2

Les Nanobodies

1 Les IgG chez les camélidés

L'immunité adaptative, commune à l'ensemble des vertébrés supérieurs, s'est imposée comme un système de défense particulièrement efficace au cours de l'évolution. Son succès repose en partie sur la réponse humorale médiée par les lymphocytes B et leur capacité à produire des milliards d'anticorps différents permettant la reconnaissance spécifique et la neutralisation de potentiellement n'importe quel envahisseur immunogène.

De par leur rôle clé dans le système immunitaire mais également en raison de leurs multiples applications biomédicales et biotechnologiques, les anticorps sont parmi les protéines les plus étudiées et les mieux caractérisées. Ce sont des glycoprotéines oligomériques réparties en plusieurs classes isotypiques appartenant à la famille des immunoglobulines. Ils partagent tous la même structure de base calquée sur celles des immunoglobulines G (IgG) qui représentent la majorité des anticorps sériques chez les mammifères.

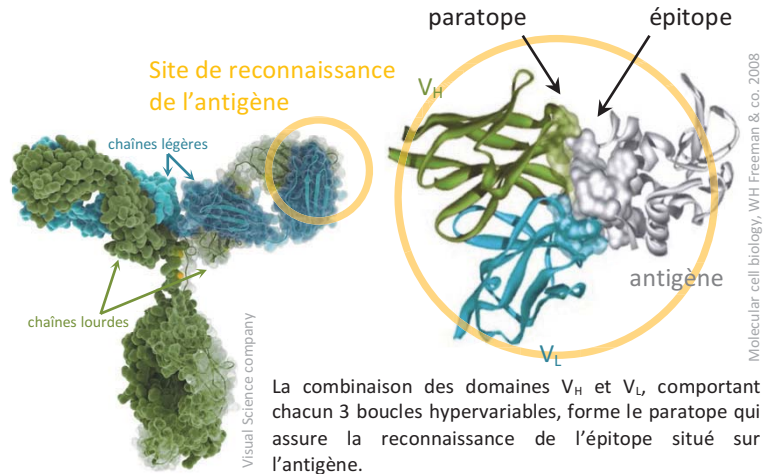
1.1 Structure d'une IgG conventionnelle

Les IgG sont des molécules symétriques en forme de Y composées de quatre chaînes polypeptidiques, identiques deux à deux et reliées covalamment par des ponts disulfures [Encadré 2.1]. On distingue deux chaînes dites lourdes (*heavy chain*, H) d'environ 50 kDa et deux chaînes dites légères (*light chain*, L) d'environ 25 kDa. Chaque chaîne (lourde ou légère) est constituée de plusieurs domaines globulaires comportant environ 110 acides aminés organisés en deux séries de feuilletts β -plissés antiparallèles dont le repliement est stabilisé par un pont disulfure intra-chaîne. Le domaine situé du côté N-proximal de chaque chaîne présente une séquence plus variable (*variable domains*, V_L ou V_H) que les domaines restants (*constant domains*, C_L ou C_{H1} à C_{H3}). C'est la combinaison des domaines variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui constitue le site de reconnaissance et de liaison à l'antigène, ou paratope, tandis que la partie constante est impliquée dans les fonctions effectrices comme la fixation du complément. Chaque région variable V_H ou V_L contient trois boucles hypervariables, numérotées d'après leur position dans la séquence peptidique, qui déterminent la complémentarité avec l'épitope de l'antigène (*Complementarity Determining Regions*, CDR1 à CDR3). Elles sont encadrées par quatre régions plus conservées qui confèrent une configuration stable aux domaines V et en constituent la "charpente" (*Framework Regions*, FR1 à FR4). Les six CDR d'un bras de l'IgG se retrouvent ainsi juxtaposés pour former une surface d'environ 600 à 900 Å² par laquelle la liaison à l'antigène a lieu (Muyldermans, 2013).

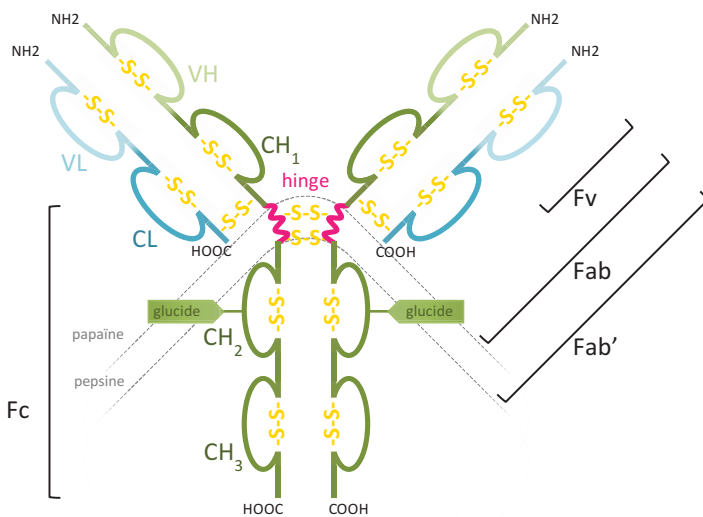
Le clivage des chaînes polypeptidiques par des enzymes protéolytiques définit différents fragments caractéristiques d'après leur fonction. En conditions contrôlées, la papaïne coupe la chaîne lourde en amont d'une région "charnière" plus flexible (*hinge*) située au niveau des ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. La digestion libère trois fragments : les deux bras de la molécule reconnaissant l'antigène (*Fragment antigen binding*, Fab) qui contiennent chacun la chaîne légère complète appariée

Encadré 2.1 | Les anticorps

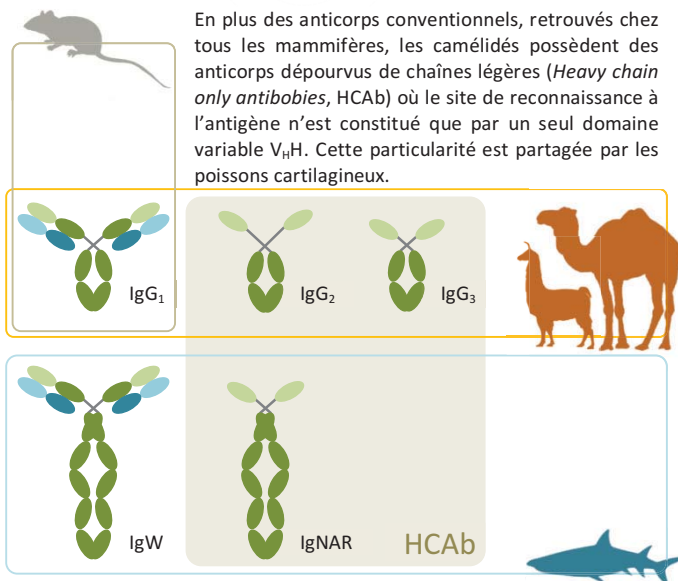
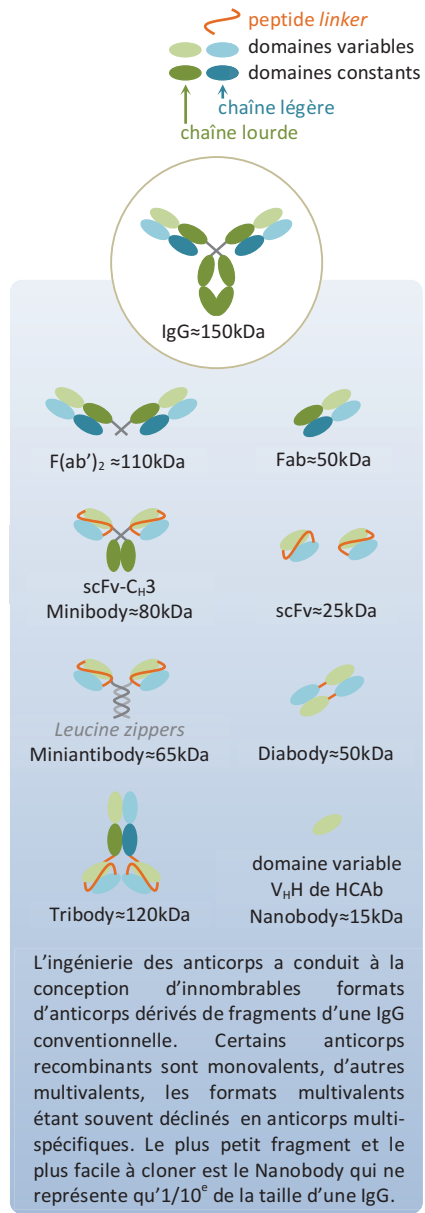
Les immunoglobulines G (IgG) sont composées de 2 chaînes lourdes (H) et de 2 chaînes légères (L), identiques entre elles et associées par des ponts disulfures inter-chaînes. Elles sont organisées en plusieurs domaines globulaires constants (C_H , C_L) et variables (V_H , V_L) stabilisés par des ponts disulfures intra-chaînes. La molécule adopte une forme en Y où chaque bras est relié au corps par une région charnière flexible (*hinge*) et porte la fonction de liaison à l'antigène.



La combinaison des domaines V_H et V_L , comportant chacun 3 boucles hypervariables, forme le paratope qui assure la reconnaissance de l'épitope situé sur l'antigène.



La protéolyse partielle d'une IgG par la papaïne génère 3 fragments (2 Fab et 1 Fc) tandis que la digestion par la pepsine produit un grand fragment $F(ab')_2$ et de multiples petits fragments dérivés de la dégradation du Fc.



En plus des anticorps conventionnels, retrouvés chez tous les mammifères, les camélidés possèdent des anticorps dépourvus de chaînes légères (*Heavy chain only antibodies*, HCAb) où le site de reconnaissance à l'antigène n'est constitué que par un seul domaine variable V_H . Cette particularité est partagée par les poissons cartilagineux.

L'ingénierie des anticorps a conduit à la conception d'innombrables formats d'anticorps dérivés de fragments d'une IgG conventionnelle. Certains anticorps recombinants sont monovalents, d'autres multivalents, les formats multivalents étant souvent déclinés en anticorps multi-spécifiques. Le plus petit fragment et le plus facile à cloner est le Nanobody qui ne représente qu' $1/10^6$ de la taille d'une IgG.

aux domaines V_H et C_{H1} de la chaîne lourde et un fragment cristallisable au froid (*Fragment crystallizable*, Fc), contenant le domaine effecteur, qui est constitué des deux domaines C_{H2} et C_{H3} appariés. La pepsine, quant à elle, clive la chaîne lourde en aval de la région charnière et libère notamment un fragment $F(ab')_2$ dans lequel les deux bras de l'immunoglobuline sont toujours réunis par les ponts disulfures. Ce fragment possède des caractéristiques de reconnaissance et une valence identiques à l'IgG d'origine (Janeway *et al*, 2001).

1.2 Anticorps recombinants

Outre les fragments générés par la digestion maîtrisée des IgG par des protéases, des molécules contenant les domaines variables et donc la capacité de reconnaissance des anticorps sont actuellement couramment produites par génie génétique [Encadré 2.1]. Les scFv (*single-chain variable fragment*) contiennent les deux domaines variables V_L et V_H reliés par un peptide flexible et dérivent généralement d'anticorps monoclonaux. Ces fragments sont modulables, notamment par couplage à des toxines en vue de leur utilisation en thérapie anticancéreuse ou par multimérisation pour aboutir à des homomultimères ou à des hétéromultimères présentant une valence accrue ou une multispécificité (Cuesta *et al*, 2010). On peut par exemple citer l'association de deux fragments scFv identiques ou différents par des domaines de dimérisation de type leucine *zipper* pour générer respectivement des *miniantibodies* mono- ou bi-spécifiques ou la liaison d'un fragment scFv au domaine C_{H3} d'une IgG humaine pour conduire à la formation d'un *minibody*. L'association naturelle entre la chaîne lourde V_H - C_{H1} et la chaîne légère V_L - C_L d'un Fab est mise à profit pour former un hétérotrimère comportant en plus deux scFv et aboutir ainsi à un *tribody* trivalent qui peut être multispécifique (Cuesta *et al*, 2010). La flexibilité apportée par ces associations a grandement bénéficié au diagnostic et à l'immunothérapie contre les cancers, mais la nécessité de combiner un domaine V_H à un domaine V_L pour former un paratope fonctionnel complique les étapes de clonage et de sélection des gènes codant pour ces domaines variables. C'est pourquoi l'identification et l'utilisation de peptides présentant des propriétés de reconnaissance sont en pleine expansion. La société *Affilogic* commercialise par exemple, sous le nom de Nanofitines, des affitines qui sont de petites protéines d'environ 7 kDa dérivant de la protéine Sac7, une protéine de liaison à l'ADN isolée de *Solfobus cidocaldarius* (Correa *et al*, 2014). On peut également citer les DARPin (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*) qui dérivent de la même façon de protéines naturelles à domaines ankyrine (Stumpp & Amstutz, 2007).

1.3 Découverte des anticorps à chaînes lourdes

1.1.1 Historique

Des anticorps composés uniquement de chaînes lourdes (*heavy-chain only antibodies*, HCAb) ont été découverts fortuitement à la *Vrije Universiteit Brussel* (VUB, Bruxelles) à la fin des années 1980 lors de travaux pratiques visant à purifier des anticorps qui, dans le contexte du développement de l'épidémie de SIDA et de renforcement des règles d'hygiène et de sécurité, ne pouvaient plus se faire à partir de sang humain. La purification a alors été réalisée à partir d'un échantillon de sang de chameau qui était disponible dans un congélateur du laboratoire. Les résultats obtenus, suggérant l'existence d'anticorps dépourvus de chaînes légères, ont nécessité deux années de recherche pour confirmer qu'il ne s'agissait pas d'un artéfact, mais bien d'une nouvelle classe d'anticorps qui coexiste avec les anticorps conventionnels chez l'ensemble des camélidés (Hamers-Casterman *et al*, 1993). L'importance de cette

découverte ne réside pas tant dans la taille plus petite de ces nouveaux anticorps, mais dans le fait que leur paratope est constitué d'un seul domaine variable (*heavy chain only variable domain*, V_HH) formé par une chaîne peptidique unique et qu'ils conservent malgré tout la même diversité de répertoire et les mêmes caractéristiques d'affinité que des anticorps conventionnels. Le clonage des V_HH, rebaptisés Nanobodies (Nb), en raison de leur taille de l'ordre du nm représentant 1/10^e de celle d'une IgG classique, a ainsi ouvert tout un champ de perspectives où ils peuvent rivaliser avec les anticorps recombinants classiques.

1.3.1 Structure

Trois types d'IgG différents peuvent être isolés à partir du sang des camélidés : des IgG conventionnelles (IgG1), et des homodimères de chaînes lourdes (IgG2 et IgG3) [Encadré 2.1], formés non pas de quatre domaines globulaires comme les IgG1 mais de trois domaines seulement. Dans les IgG2 et les IgG3, le domaine C_H1 est absent et le domaine variable V_HH est donc directement relié au *hinge* dont la taille définit l'appartenance au type IgG2 (*hinge* long de 15 à 35 acides aminés) ou au type IgG3 (*hinge* court de 12 acides aminés) (Vincke & Muyldermans, 2012). Les domaines C_H2 et C_H3 sont conservés et constituent, comme pour les IgG conventionnelles, le fragment Fc. Le fragment Fab est ainsi réduit à un unique domaine V_HH qui constitue le plus petit fragment intact d'anticorps connu capable de se lier à un antigène. Ces IgG à chaînes lourdes représentent en moyenne plus de 50 % des IgG totales chez les camélidés de l'Ancien Monde (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*) et environ 30 % chez les camélidés du Nouveau Monde (*Lama glama*, *Lama guanicoe*, *Vicugna pacos*, *Vicugna vicugna*) (Vincke & Muyldermans, 2012). L'absence du domaine C_H1 est probablement directement liée à l'absence de chaîne légère. En effet, lors de leur synthèse, les chaînes lourdes sont retenues dans le reticulum endoplasmique par l'interaction de leur domaine C_H1 avec des chaperones et c'est le déplacement de ces chaperones, provoqué par les chaînes légères, qui permet la sécrétion des IgG classiques. Dans les IgG dépourvues de chaînes légères, la suppression du domaine C_H1 est donc essentielle pour leur sécrétion (Vincke & Muyldermans, 2012).

1.3.2 Rôle dans l'immunité des camélidés

Le rôle des IgG à chaînes lourdes dans l'immunité des camélidés est loin d'être compris à l'heure actuelle. Leur taille réduite et leur structure compacte ont été évoquées pour cibler des antigènes particuliers et augmenter le répertoire immunitaire de ces animaux (Muyldermans, 2013). Leur représentation dans le colostrum, le lait et le sérum de lamas femelles venant de mettre bas indique leur importance dans la transmission passive de l'immunité aux lamas nouveaux-nés (Daley-Bauer *et al*, 2010). Le marquage, dans les tissus lymphoïdes adultes, des lymphocytes B produisant ces différents types d'IgG a montré une distribution similaire à celle des cellules B produisant des IgG conventionnelles, avec des cellules produisant les IgG3 au niveau des plaques de Peyer, en accord avec un éventuel rôle dans l'immunité des muqueuses (Daley-Bauer *et al*, 2010). Un rôle plus spécifique des IgG2 dans la réponse immunitaire induite par les nématodes et des IgG3 dans la réponse aux virus a été suggéré (Daley, 2007).

1.3.3 Évolution

De façon remarquable, des anticorps à chaînes lourdes sont aussi retrouvés chez les poissons cartilagineux comme les requins (*Orectolobus maculatus*, *Squalus acanthia*, *Ginglymostoma cirratum*,

Chiloscyllium plagiosum...) ou la chimère tachetée (*Hydrolagus coliei*). Ces anticorps (*Immunoglobulin New Antigen Receptor*, IgNAR) sont à comparer aux anticorps classiques de poissons cartilagineux (IgW) qui, comme les IgG de mammifères, possèdent une chaîne légère constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable, mais qui par contre possèdent une chaîne lourde comprenant six domaines constants en plus du domaine variable. Comme les IgG de camélidés, les IgNAR sont des homodimères constitués d'un seul domaine variable (*new antigen receptor variable domain*, V-NAR) et de cinq domaines constants, le premier domaine constant qui assure la rétention dans le réticulum endoplasmique étant perdu, comme dans les HCAB de camélidés.

La coexistence d'Ig conventionnelles et de HCAB dans des branches éloignées de l'arbre phylogénétique des vertébrés soulève la question des raisons de cette convergence dans l'évolution des anticorps. Une hypothèse réaliste évoque l'avantage procuré par ces anticorps capables de reconnaître des antigènes concaves, difficilement accessibles aux anticorps associant des domaines V_H et V_L (Flajnik *et al*, 2011; Smolarek *et al*, 2012).

2 Nanobody

2.1 Structure d'un Nanobody

Un Nb, consistant en un unique domaine globulaire d'IgG, comporte environ 110 acides aminés agencés en deux ensembles de quatre et cinq feuillettes β antiparallèles. Il prend une forme oblongue d'un diamètre d'environ 2,5 nm pour une hauteur d'environ 4 nm. L'organisation génétique des Nb est très similaire à celle des V_H d'IgG classiques avec quatre régions FR conservées qui entourent les trois régions CDR hypervariables conférant la spécificité de reconnaissance à l'anticorps [Figure 2.1]. Dans la structure tertiaire du Nb, ces trois CDR, localisés dans des boucles entre les feuillettes β , sont regroupés sur une face de la molécule, du côté N-terminal. De façon caractéristique, les CDR1 et CDR3 des V_HH sont plus longs que ceux des V_H . Une autre différence importante réside dans le FR2 qui, dans les V_H , est une région très conservée et riche en acides aminés hydrophobes car assurant l'interaction avec le domaine V_L des chaînes légères. Dans les V_HH , le FR2 contient quatre acides aminés hydrophiles qui expliquent l'absence d'assemblage à une chaîne légère et leur solubilité élevée (Muyldermans *et al*, 2009).

La diversité des paratope des IgG conventionnelles provenant principalement de la combinaison d'un V_L et d'un V_H , on s'attendrait à ce que cette diversité soit moindre dans les V_HH . Ce n'est pas le cas, très probablement parce que la plus grande taille des CDR1 et CDR3 de V_HH et leur conformation plus variée compensent cette limitation du répertoire (Muyldermans *et al*, 2009). De même, la taille du paratope est maintenue, très certainement par la taille accrue des CDR1 et CDR3, ainsi que la surface d'interaction avec l'antigène (600-800 Å²), alors que l'empreinte du paratope sur l'épitope, est légèrement plus petite que celle d'une IgG classique. Cette différence s'explique par la forme convexe des V_HH qui reconnaissent préférentiellement des antigènes concaves tandis que les paratopes d'IgG conventionnelles sont plus plats et reconnaissent plutôt des antigènes plans ou convexes (De Genst *et al*, 2006; Muyldermans *et al*, 2009) [Figure 2.1]. Tandis que les six CDR des paires V_H/V_L contribuent à peu près à parts égales à la reconnaissance de l'épitope, la part du CDR3 prédomine dans les V_HH où il participe pour 60 à 80 % au contact avec l'épitope (Muyldermans *et al*, 2009).

En plus du pont disulfure canonique intradomaine, reliant le FR1 et le FR3 aussi bien des V_H que des V_HH , les V_HH se distinguent également par la présence occasionnelle d'un pont disulfure additionnel qui participe probablement à la stabilisation du long CDR3. Reliant généralement le CDR3 au CDR1 chez les

chameaux, ce pont additionnel est également observé, bien que moins fréquemment, chez les lamas entre le CDR3 et le CDR2. Il a aussi été décrit dans les V-NAR de requin (Wesolowski *et al*, 2009; Muyldermans, 2013) laissant supposer que l'augmentation de stabilité qu'il apporte pourrait être nécessaire au maintien de la fonction des ces HCab dans les conditions physiologiques difficiles de température élevée (habitat aride des camélidés) ou de forte concentration en urée (sang des requins) (Vincke & Muyldermans, 2012).

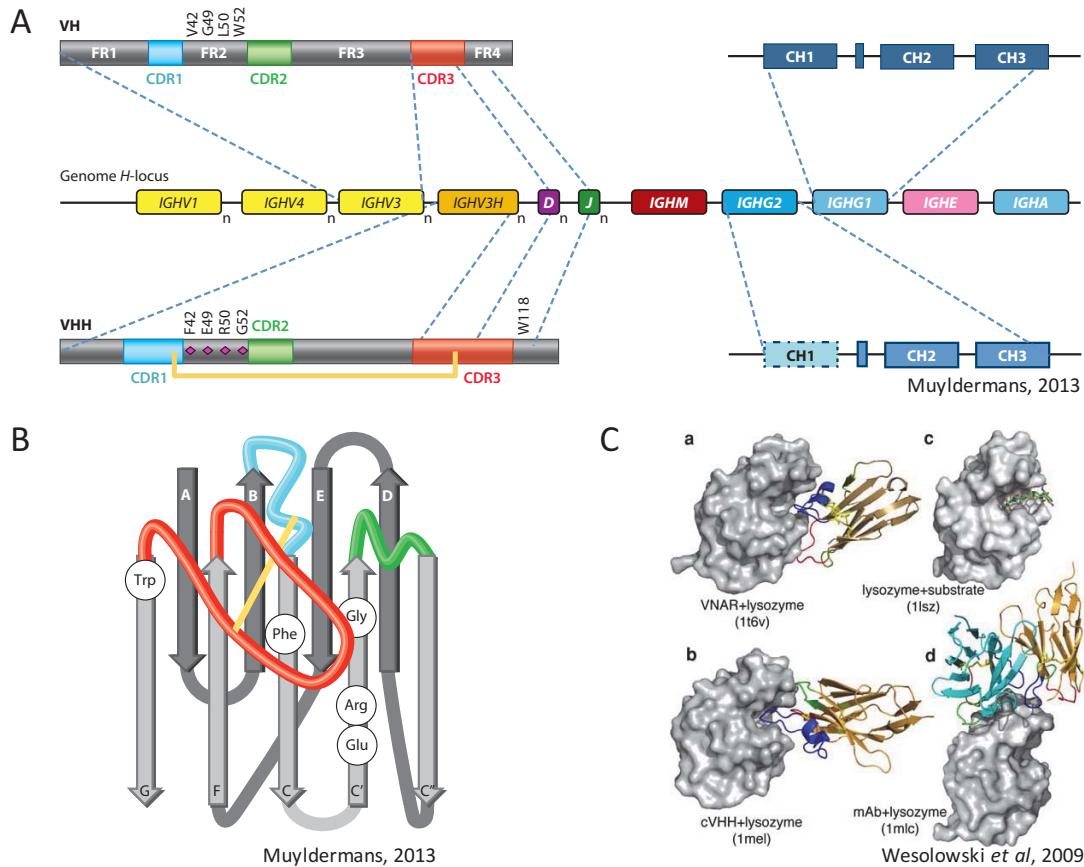


Figure 2.1 | Structure primaire et tertiaire des $V_H H$.

A. Organisation simplifiée des segments de gènes du locus H du génome des camélidés et représentation du réarrangement de gènes à l'origine de la diversité du répertoire de leurs anticorps. Pendant la lymphopoïèse des cellules B, un gène V (ici IGHV3) se réarrange avec un élément D et un élément J pour former le domaine V_H , le CDR3 étant formé par la jonction IGHV3-D-J. Ce gène réarrangé est d'abord exprimé à partir d'un promoteur en amont du gène IGHM puis après un changement de classe, il est coexprimé avec un gène IGHG1 (comprenant les exons codant pour un domaine CH1, un *hinge*, un domaine CH2 et un domaine CH3) pour former une IgG1 conventionnelle. Dans d'autres lymphocytes B, IGHV3H se réarrange avec un élément D et un élément J du même locus pour former un domaine $V_H H$ et est finalement coexprimé avec un gène dédié au HCab (ici IGHG2). L'exon correspondant au domaine C_H1 est éliminé lors de l'épissage du mRNA. Les V_H et $V_H H$ sont représentés avec leurs FR et leurs CDR et les acides aminés du FR2 caractéristiques des V_H et $V_H H$ sont indiqués par le code à 1 lettre et leur position dans la séquence (d'après Muyldermans, 2013). **B.** Schéma de la conformation d'un $V_H H$ montrant l'organisation en feuillets β antiparallèles reliés par les boucles formant les CDR1 (bleu), CDR2 (vert) et CDR3 (rouge). Les acides aminés clés interagissant dans un V_H avec un V_L qui sont substitués dans un $V_H H$ sont indiqués par le code à 3 lettres. Dans les $V_H H$ ils sont exposés au solvant hormis Phe₄₂ et Gly₅₂ qui sont généralement recouverts par le long CDR3, parfois stabilisé par un pont disulfure additionnel (jaune) (d'après Muyldermans, 2013). **C.** Comparaison des structures 3D de deux anticorps simple chaîne neutralisants dérivés de HCab de requin (a, pdb 1t6v, VNAR) ou de chameau (b, pdb 1mel, cVHH) avec les structures 3D du substrat de l'enzyme (c, pdb 1lsz) ou des domaines V_H et V_L d'un anticorps monoclonal conventionnel (d, pdb 1mlc), complexées avec le lysozyme de poulet. Les CDR sont représentés en rouge (CDR1), vert (CDR2) et bleu (CDR3). Tandis que les CDR3 du VNAR et du cVHH s'insèrent dans le site actif de l'enzyme, la surface d'interaction de l'anticorps monoclonal est plane et située en dehors de la crevasse du site catalytique (d'après Wesolowski *et al*, 2009).

2.2 Réarrangement des gènes

La découverte dans les années 1970 du réarrangement des gènes (*variable–diversity–joining rearrangement*, *VDJ rearrangement*) qui se produit au cours du développement des cellules B et de l'hypermutation somatique dans les cellules B matures a permis de commencer à comprendre pourquoi le répertoire des anticorps était aussi étendu (Flajnik & Kasahara, 2010).

Les régions variables des anticorps classiques sont obtenues par le réarrangement, dans les cellules souches, de fragments V, D et J pour les chaînes lourdes et V et J pour les chaînes légères, ces fragments se situant dans le locus H du génome, en amont des séquences codant pour les domaines constants C_{H1} à C_{H3} [Figure 2.1]. Pour l'obtention de HCAb, ce sont des fragments V spécifiques qui sont ré-arrangés avec des fragments D et J classiques et la région C_{H1} est éliminée de l'ARN messager (*messenger RNA*, mRNA) par épissage (Muyldermans 2013). Cet épissage ne semble pas nécessiter de facteurs cellulaires propres aux camélidés puisque le transfert d'un gène réarrangé dans des cellules de souris en culture a abouti à la production de HCAb fonctionnels (Muyldermans, 2013), indiquant que l'environnement nucléotidique de la région C_{H1} contient son propre signal d'épissage. Comme c'est à la jonction des fragments V-D-J que se forme le CDR3 et que les fragments D et J sont communs aux V_{H1} et aux V_H , il faut supposer que des V_{H1} avec des boucles CDR3 courtes sont générés mais que les cellules B les exprimant ne sont pas sélectionnées lors de l'amplification clonale des lymphocytes qui suit l'exposition à l'antigène. Tout comme les CDR3 des V_{H1} , les CDR3 des V_H peuvent encore être modifiés par addition ou élimination de nucléotides au niveau des jonctions des fragments de DNA.

Outre cette diversité due aux réarrangements de gènes au cours du développement des cellules B dans les organes lymphoïdes centraux, la diversité du répertoire est également amplifiée par l'hypermutation somatique qui intervient dans les organes lymphoïdes périphériques lors de la réponse immunitaire. Ces mutations ponctuelles à très haute fréquence et leur sélection par la liaison à l'antigène sont à l'origine de la maturation de la population d'anticorps par affinité (Janeway *et al*, 2001). Par rapport aux CDR1 de V_H , les CDR1 des V_{H1} contiennent deux *hotspots* d'hypermutation somatique supplémentaires, conduisant à une plus forte variabilité des résidus de cette boucle. Ce phénomène contribue à ce que les HCAb, bien que dépourvus de la diversité due à la combinaison de domaines V_H et V_L , possèdent un répertoire comparable aux IgG conventionnelles (Muyldermans *et al*, 2009).

2.3 Propriétés biophysicochimiques et avantages des Nanobodies

Le premier avantage des Nb réside probablement dans leur structure monomérique qui simplifie considérablement leur clonage à partir des mRNA des lymphocytes B et leur expression sous forme libre ou fusionnée et à des niveaux élevés dans différents organismes (bactéries, levures, plantes, cellules animales) (cf Chapitre 3.1.1 : Des anticorps recombinants faciles à obtenir). Leur petite taille leur confère une pénétration tissulaire bien meilleure que celle des scFv ou des anticorps classiques et leur autorise aussi le passage de la barrière hémato-encéphalique (Smolarek *et al*, 2012) ce qui leur permet d'accéder à des antigènes jusqu'alors hors d'atteinte. L'accès à des épitopes enfouis est aussi possible grâce à leur propension à reconnaître des structures concaves comme les sillons des enzymes (De Genst *et al*, 2006). Enfin leur nature simple chaîne facilite leur déclinaison en anticorps bi- ou tri-spécifiques ou leur multimérisation et leur ressemblance avec les domaines V_H humains les rendent peu ou pas immunogènes, des qualités appréciables pour une utilisation en santé humaine (Muyldermans, 2013).

Leur grande stabilité et donc leur résistance à des conditions physicochimiques extrêmes est

cependant la caractéristique qui permet d'envisager les utilisations les plus inattendues. Ainsi des Nb anti-caféine ont été développés pour contrôler, par des tests sérologiques sur bandelettes, la concentration en caféine dans diverses boissons chaudes (Ladenson *et al*, 2006). La stabilité des Nb à haute température s'avère donc très utile dans le domaine agroalimentaire (Huang 2010) et a aussi été mise à profit dans la purification de $V_{\text{H}}\text{H}$, en remplaçant la chromatographie d'affinité habituelle par une simple étape de dénaturation des protéines du périplasme bactérien par la chaleur (15 min à 70 °C) (Olichon *et al*, 2007).

Cette plus grande stabilité des Nb en conditions extrêmes relève de leurs propriétés intrinsèques, mais peut également être conditionnée à une étape de sélection des meilleurs Nb se liant à un antigène donné ou par réarrangement de séquences/mutagenèse (*DNA shuffling*). Dans le but de limiter la croissance de micro-organismes impliqués dans la formation des pellicules, un Nb dirigé contre la protéine de surface Malf1 du champignon *Malassezia furfur* a été sélectionné par *phage display* en condition de forte concentration de shampooing. Ce travail a permis d'obtenir plusieurs Nb très stables dans le shampooing mais aussi dans d'autres conditions dénaturantes comme une forte concentration en urée et a permis d'identifier l'Arg44 comme responsable de cette augmentation de stabilité (Dolk *et al*, 2005). Cette grande stabilité des Nb a aussi été exploitée dans l'élaboration de Nb pour la détection des sérotypes de toxine botulique dans des environnements aussi drastiques que le jus d'orange ou le soda au cola (Conway *et al*, 2010). Cette fonctionnalité dans le cola illustre la stabilité des Nb à des pH extrêmes, propriété qui a aussi mené à la production de Nb dirigés contre une uréase d'*Helicobacter pylori*, bactérie impliquée dans les ulcères de l'estomac (Ardekani *et al*, 2013). Les Nb retenus présentent une activité inhibitrice de la bactérie mais aussi une bonne résistance à la pepsine en présence d'acide chloridrique, deux caractéristiques importantes pour envisager l'administration orale de ces Nb pour le traitement des ulcères de l'estomac. La sélection de Nb possédant une stabilité accrue aux protéases a également été décrite dans une étude visant à utiliser des Nb en immunothérapie orale contre des diarrhées à *E. coli* chez les porcelets (Harmsen *et al*, 2006). La stabilité gastro-intestinale de Nb neutralisant la toxine A de *Clostridium difficile*, quant à elle, a été améliorée par l'insertion d'un pont disulfure supplémentaire (Hussack *et al*, 2011). Enfin deux Nb produits contre l'aflatoxine AFB1 d'*Aspergillus flavus* et d'*A. paraciticus* ont montré une fonctionnalité préservée en présence de solvants organiques comme le méthanol, l'acétone ou l'acétonitrile, nécessaires à l'extraction de ce métabolite hautement lipophile, une propriété devant faciliter le développement de colonnes d'affinité compatibles avec l'extraction de cette toxine (He *et al*, 2014).

3 Applications des Nanobodies

Les propriétés biophysiques, fonctionnelles et structurales uniques des Nb en font des outils exceptionnels, exploitables dans de nombreux domaines (pour revue voir Wesolowski *et al*, 2009; Huang *et al*, 2010; de Marco, 2011; Smolarek *et al*, 2012; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al*, 2013; Muyldermans, 2013). À ce titre, les Nb sont en passe de devenir omniprésents dans les secteurs de la recherche, du diagnostic ou de la médecine et de nouvelles publications relatant la validation de principe de leur utilisation s'accumulent chaque jour un peu plus dans la littérature scientifique. Ce paragraphe n'est de ce fait pas destiné à établir une liste exhaustive de toutes les applications des Nb qui serait interminable et indigeste, mais plutôt d'en illustrer l'énorme diversité par quelques exemples représentatifs particulièrement innovants, surprenants ou récents, sélectionnés notamment en raison de l'apport indéniable des Nb à leur succès.

3.1 Recherche

3.1.1 Imagerie

Depuis la première mention de Nb fusionnés à une protéine fluorescente, exprimés dans des cellules de mammifères pour marquer des antigènes *in vivo* au niveau de différents compartiments subcellulaires tout au long du cycle cellulaire (Rothbauer *et al*, 2006), de nombreux Nb ont été utilisés afin d'éviter de fusionner les protéines cibles endogènes à des protéines fluorescentes. Le développement de Nb à des fins d'imagerie a eu recours à la fusion à des protéines fluorescentes mais aussi au couplage à des fluorochromes de la famille des alexa, aux *quantum dots* (Di Wang *et al*, 2015), à l'or (Leduc *et al*, 2013) et à des radioéléments (Vaneycken *et al*, 2011). Les applications de ces outils d'imagerie sont multiples, allant de la biologie cellulaire à l'imagerie médicale, et certaines de ces techniques sont déjà en phase de test pré-clinique ou clinique (Romer *et al*, 2011). Ce succès en imagerie cellulaire et/ou médicale est notamment dû à leur petite taille qui permet une bonne pénétration dans les tissus, y compris le passage de la barrière hémato-encéphalique, à leur très haute spécificité assurant un très bon rapport signal/bruit et à leur rapide élimination par l'organisme (Romer *et al*, 2011; Vaneycken *et al*, 2011). Les avancées les plus récentes font état de la possibilité d'utiliser les Nb pour l'imagerie cellulaire dynamique à très haute résolution (Leduc *et al*, 2013; Albrecht *et al*, 2015; Platonova *et al*, 2015).

3.1.2 Chaperonnes de cristallisation

Les Nb se sont révélés de très bons alliés dans les études structurales, notamment en raison de leur capacité à favoriser la cristallisation de protéines récalcitrantes, soit en augmentant leur solubilité, soit en stabilisant des régions flexibles (Desmyter *et al*, 2015). Ainsi, en bloquant des récepteurs membranaires dans une conformation proche de celle adoptée lors de la liaison à un agoniste (Kruse *et al*, 2013) ou en bloquant la région N-terminale flexible de la protéine PrP du prion humain, les Nb ont permis l'obtention de leur structure par cristallographie (Abskharon *et al*, 2014). De plus, la grande solubilité des Nb ($\geq 40 \text{ mg.ml}^{-1}$) réduit le risque d'obtenir des cristaux de Nb non complexés à leur cible et le développement de protocoles de sélection adaptés à la biologie structurale rend possible l'obtention d'une structure cristallographique assistée par des Nb en six à douze mois (Pardon *et al*, 2014).

3.1.3 Nanotrapping

L'utilisation de Nb pour piéger des antigènes (*nanotrapping*), a été appliquée aussi bien *in vitro* dans des approches biochimiques pour purifier des complexes protéiques qu'*in vivo* dans des approches d'immunomodulation pour modifier la fonction de protéines cellulaires (Jobling *et al*, 2003; Rothbauer *et al*, 2008). Les exemples se sont multipliés et les techniques ont été déclinées pour visualiser des interactions protéine/protéine (Katoh *et al*, 2015; Groll *et al*, 2015), pour induire la dégradation spécifique de protéines fusionnées à la GFP en les adressant au protéasome (*deGradFP*) (Causinus *et al*, 2011), pour suivre et cibler des enzymes *in vivo* (*track and target*) (Jiménez *et al*, 2015) ou encore pour relocaliser des protéines voire des organites, comme l'illustre le repositionnement des magnétosomes de *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Borg *et al*, 2015; Pollithy *et al*, 2011).

3.2 Diagnostic et détection

Les Nb présentent des avantages de taille, d'affinité, de facilité de production à grande échelle et de

stabilité qui en font des outils de choix dans les tests classiques de détection, utilisés à des fins de diagnostic (pour revue voir Siontorou, 2013; Huang *et al*, 2010). Comme ils sont recombinants, les Nb sont facilement modifiables pour en augmenter la valence, pour orienter leur immobilisation sur un support ou pour les fusionner à n'importe quelle protéine rapporteuse. Leur processus de sélection permet de plus d'éliminer des problèmes de réaction croisée (Huang *et al*, 2010). Ainsi, un ELISA permettant une détection rapide, sensible et à moindre coût a été mis au point pour la détection du virus H5N1 de la grippe (Zhu *et al*, 2014). Ce test en double sandwich utilise deux Nb dont l'un est biotinylé *in vivo* au cours de sa production en bactéries. De même les Nb peuvent facilement être fusionnés à des enzymes classiquement utilisées pour la révélation des ELISA, comme la phosphatase alcaline ce qui peut conduire à une augmentation de la sensibilité du Nb (Swain *et al*, 2011).

Des Nb dirigés contre une gingipaïne de *Porphyromonas gingivalis* se sont révélés efficaces dans la détection, dans la salive, de cette bactérie responsable de parodontite ce qui constitue une avancée importante pour la prévention de la maladie et son suivi au cours du traitement (Skottrup *et al*, 2011). Les Nb ont aussi montré une efficacité supérieure aux anticorps monoclonaux pour la détection du virus de la dengue dans un test sur bandelettes (Fatima *et al*, 2014). De même un Nb dirigé contre une protéine de la salive de la mouche tsé-tsé a montré que les V_HH sont performants dans des ELISA par compétition pour détecter des piqûres sur des mammifères et donc estimer la prolifération de ce vecteur de trypanosomes (Caljon *et al*, 2015). Enfin les Nb peuvent être utilisés comme anticorps anti-idiotypiques pour remplacer des haptènes dans des tests de phage-ELISA par compétition (Xu *et al*, 2015).

Outre ces techniques classiques, les Nb se sont aussi peu à peu imposés dans un grand nombre de systèmes innovants de détection et de diagnostic telles que les techniques de *microarray* (Even-Desrumeaux *et al*, 2010) ou bien la technologie de *biolayer interferometry* qui a permis, par exemple, de doser l'érythropoïétine (EPO) dans des cellules en culture (Kol *et al*, 2015). L'interaction entre la GFP et un Nb anti-GFP a également servi pour évaluer différents supports et différentes conditions d'expérimentation par résonance plasmonique de surface (Pia & Martinez, 2015), le faible poids moléculaire des Nb les rendant particulièrement attractifs pour ce type de technique. Enfin, on peut citer l'apport des Nb pour la détection de fibrinogène dans le plasma humain par un système microfluidique ampérométrique et magnétique jetable (Campuzano *et al*, 2014) ou pour la détection du Porcine circovirus type 2 à l'aide de billes magnétiques et de *quantum dots* (Yang *et al*, 2015).

3.3 Thérapeutique

Le domaine médical constitue probablement le secteur principal de développement et d'utilisation des Nb. Les anticorps monoclonaux, grâce à leur possible sélection, à leur production clonale et à leur relative modularité, avaient déjà ouvert la voie de l'immunothérapie. Les Nb possèdent ces mêmes qualités, souvent de façon amplifiée, ils sont plus faciles et moins chers à produire, ils reconnaissent des épitopes souvent moins accessibles avec des constantes d'affinité meilleures, ils pénètrent plus facilement les tissus, ils traversent la barrière hémato-encéphalique et ils sont plus robustes et mieux éliminés par le système rénal, ce qui conduit à les utiliser pour de très nombreuses applications en thérapie humaine et animale.

La propension des Nb à reconnaître des épitopes conformationnels et leur petite taille en font des outils particulièrement bien adaptés à la liaison à des sites actifs d'enzymes situés dans des sillons de ces protéines et donc à leur inhibition (Lauwereys, 1998). Cette propriété a été utilisée pour développer des Nb neutralisant la toxine de scorpion (Hmila *et al*, 2010), la toxine de *Clostridium difficile*, un pathogène

associé aux infections nosocomiales en Amérique du nord (Hussack *et al*, 2011) ou le venin de vipère (Harrison *et al*, 2006) ou de cobra (Richard *et al*, 2013). Dans le même ordre d'idées, des Nb dirigés contre des épitopes cryptiques conservés chez l'hémoparasite *Trypanosoma brucei* qui a développé des mécanisme d'évasion aux IgG classiques semblent prometteurs pour le traitement de la trypanosomiase humaine africaine (Stijlemans *et al*, 2011).

La robustesse des Nb, particulièrement résistants aux pH acides et à la protéolyse pepsique qui existent dans le milieu gastro-intestinal, a été exploitée pour une administration orale des médicaments, une modalité diminuant les contraintes et améliorant considérablement le confort des patients. C'est le cas des Nb permettant de lutter contre *C. difficile* (Kandalaft *et al*, 2015) ou contre les rotavirus (Tokuhara *et al*, 2013), mais aussi contre des affections plus bénignes comme la carie dentaire (Szynol *et al*, 2004; Krüger *et al*, 2006). La transformation de micro-organismes avec des gènes de Nb a permis d'expérimenter une production *in situ*, dans le colon de souris, de Nb anti-TNF (*Tumor necrosis factor*) pour lutter contre la colite chronique, soit par *Lactococcus lactis*, (Vandenbroucke *et al*, 2009) soit par *Bifidobacterium longum* (Shkoporov *et al*, 2015), ouvrant ainsi la voie à une thérapie efficace par des probiotiques. L'immunothérapie anti-TNF fait aussi partie de l'arsenal des biothérapies pour le traitement des patients atteints de pathologies auto-immunes ou inflammatoires graves (polyarthrite rhumatoïde, spondyloarthrites, maladie de Crohn...) (Goëb *et al*, 2013). Dans une étude récente, les chercheurs ont montré, sur un modèle murin, que des Nb anti-TNF exprimés dans des grains de riz s'y accumulent à forte concentration et conservent leur activité neutralisante (Abe *et al*, 2014), un résultat permettant là aussi d'envisager une médication par la voie alimentaire. Une administration de Nb par nébulisation a également été mise au point par la société *Ablynx* pour lutter contre le *Human respiratory syncytial virus* (RSV) et est actuellement en essai clinique (Koussoroplis & Vanbever, 2013).

La petite taille et la présence de résidus hydrophyles dans le FR2 des Nb leur permettent de passer la barrière hémato-encéphalique, contrairement aux anticorps classiques, une caractéristique permettant d'envisager leur utilisation dans la lutte contre des maladies neurologiques. Deux Nb dirigés contre la β -amyloïde, au niveau de sa région centrale impliquée dans l'agrégation liée à la maladie d'Alzheimer, ont été obtenus et pourraient avoir une application dans le diagnostic et/ou la thérapie (Paraschiv *et al*, 2012). De la même façon, des Nb dirigés contre la huntingtine, protéine dont une forme mutée intervient dans la maladie de Huntington, ouvre des voies thérapeutique et diagnostique (Schut *et al*, 2014). On peut donc prévoir que, sous peu, les maladies neurodégénératives pourront avoir les mêmes perspectives immunothérapeutiques que les autres maladies ce qui était auparavant inenvisageable avec les anticorps conventionnels.

L'activité neutralisante des Nb et leur faible immunogénicité, en raison de la similitude des domaines V_{HH} avec les domaines V_H humains, est utilisée dans la recherche de solutions thérapeutiques antivirales (pour revue voir Vanlandschoot *et al*, 2011). Dans cette optique, les Nb sont d'autant plus intéressants que les virus utilisent souvent des résidus localisés dans des dépressions de la capsid pour s'arrimer aux récepteurs cellulaires, ce qui permet à ces régions nécessairement conservées d'échapper à la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte qui s'adapte aux épitopes plus plans ou convexes du virus (Wesolowski *et al*, 2009). Ainsi des Nb neutralisants ont été obtenus contre des virus humains aussi variés que les virus du SIDA, des hépatites B et C, de la grippe, du poliovirus ou de la rage (Jittavisutthikul *et al*, 2015; Tarr *et al*, 2013; Guedon *et al*, 2015; Ashour *et al*, 2014) mais aussi contre le phage p2. Le gène codant pour ce dernier Nb, intégré dans le génome de *Lactococcus lacti* permet la protection des bactéries par elle-mêmes et constitue une approche de vaccination intéressante pour des micro-organismes d'intérêt biotechnologique (de Marco, 2011).

L'utilisation combinée des Nb et des particules virales qui s'autoassemblent (*Virus-like particles*, VLP) ouvre également de larges horizons, aussi bien en thérapie génique qu'en nanotechnologie. En effet la malléabilité des Nb permet de les adapter sur des VLP comme cela a été validé avec le Nb anti-GFP fusionné à des VLP de HBV (Peyret *et al*, 2015). On peut ainsi envisager qu'on puisse, à des fins technologiques ou thérapeutiques, lier toutes sortes de molécules à la surface des VLP via la reconnaissance par les Nb. Cette possibilité est également particulièrement attrayante pour modifier le tropisme des vecteurs viraux de thérapie génique afin de cibler des cellules tumorales par la reconnaissance spécifique d'antigènes de surface (Kaliberov *et al*, 2014). Par exemple, des Nb anti-HER2, un antigène fortement exprimé à la surface des cellules des tumeurs ovariennes ou du sein, ont été couplés à des billes d'or pour une expérience de thérapie photothermique qui a prouvé l'efficacité de la méthode en système cellulaire (Van de Broek *et al*, 2011). De façon générale, l'utilisation des Nb pour l'immunociblage des cellules cancéreuses, en chimiothérapie, en thérapie génique ou toute thérapie à venir, est en pleine expansion et ne paraît pas avoir de limites, du fait de la facilité d'obtention et de modification de ces Nb.

Enfin, la fonction chaperone des Nb ouvre de nouvelles voies thérapeutiques comme c'est le cas pour les maladies amyloïdes. En effet dans l'amylose familiale où des fragments de la protéine gelsoline provoquent les dépôts insolubles à l'origine de la maladie, une mutation induisant la protéolyse aberrante de la protéine a été identifiée. Des Nb dirigés contre un intermédiaire de protéolyse mais pas contre la forme native de la gelsoline ont montré, sur un modèle murin, leur efficacité à masquer cet intermédiaire et à réduire ainsi la cascade protéolytique et le dépôt amyloïde (Van Overbeke *et al*, 2015).

Les Nb ont donc prouvé leur immense potentiel thérapeutique dans des modèles cellulaires et animaux de nombreuses maladies et certains sont déjà en phase III d'essai clinique (Nb anti-RSV, *Ablynx*). Ces nouveaux médicaments présentent, soit de nouvelles solutions, soit des modes d'administration permettant de diminuer les effets secondaires ou les contraintes liés à la thérapie.

3.4 Défense et environnement

Dans le contexte actuel de mondialisation amplifiant les flux migratoires, il y a un besoin croissant de réactifs robustes pour la détection de maladies infectieuses émergentes ou d'agents du bioterrorisme. Le Département de la Défense des Etats-Unis, par exemple, supporte de nombreux programmes de recherche visant à recourir aux Nb pour pallier les limites de stabilité ou de reconnaissance des anticorps conventionnels. La grande thermostabilité des Nb permet notamment d'envisager de s'affranchir de la nécessité de conservation au froid des réactifs immunologiques ce qui facilite leur utilisation par les troupes en première ligne ou par les premiers intervenants dans une situation d'urgence. De nombreux Nb se sont révélés performants pour la détection d'agents biologiques à caractère dangereux comme par exemple l'anthrax (Walper *et al*, 2014a; 2013), la ricine (Turner *et al*, 2015), la toxine botulique (Conway *et al*, 2010), le virus de la vaccine (Walper *et al*, 2014b), le virus ebola ou le virus de Marburg (Sherwood & Hayhurst, 2013). La simplicité à biotinyler *in vivo* les Nb a également été mise à profit pour le développement en un temps minimal de tests de détection de nouveaux virus ou toxines comportant un risque biologique majeur (Sherwood & Hayhurst, 2012). À d'autres fins, l'*United States Air Force* s'est également intéressée aux propriétés uniques des Nb. Le kérosène, dans lequel se forment des poches aqueuses où des micro-organismes peuvent se développer et former des biofilms engendrant une baisse de performance du matériel et un risque accru pour la santé du personnel, constitue un environnement particulièrement incompatible avec l'utilisation d'anticorps classiques pour détecter et éliminer

rapidement ces micro-organismes. Dans une étude récente, des Nb dirigés contre la protéine sécrétée LcrV de *Yersinia* spp ont été utilisés pour détecter de manière pécoce d'éventuels biocontaminants dans un mélange kérosène/eau (Chapleau *et al*, 2014).

Dans le domaine de la bioremédiation, pour détecter des enzymes catalytiques dans des échantillons prélevés dans différents environnements (sols, écosystèmes aquatiques), des Nb anti-biphényl 2,3-dioxygénase qui permettent de révéler la présence de cette enzyme dans le protéome d'une usine de traitement de déchets pétroliers ont été sélectionnés par une méthode de *Western panning* (Fraile *et al*, 2013). Les Nb sont de bons anticorps pour détecter des protéines et des peptides, mais peuvent aussi s'avérer efficaces contre de petites molécules comme le tetrabromobisphénol A, un retardateur d'incendie susceptible d'être relargué dans l'environnement au cours de sa production, de son utilisation ou de son élimination. Afin d'évaluer l'exposition des personnes travaillant à son contact, un ELISA à base de Nb a pu avantageusement remplacer les techniques classiques de chromatographie généralement employées (Wang *et al*, 2014), démontrant l'intérêt des Nb dans le domaine de la prévention. De la même façon, les Nb se sont montrés avantageux dans le secteur agro-alimentaire pour la détection de différentes mycotoxines posant d'important problèmes de sécurité alimentaire (Xu *et al*, 2015; Liu *et al*, 2015). Enfin, dans un but de prospection environnementale, des Nb dirigés contre des protéines de surface de *Chlamydomonas reinhardtii* ont permis de développer un ELISA sur cellules vivantes pour détecter des algues chlorophycées dans des échantillons d'eau (Jiang *et al*, 2014).

3.5 Perspectives

Les peptides présentant des fonctions de liaison, comme les anticorps à simple domaine provenant des camélidés ou des poissons cartilagineux, ont prouvé leur utilité dans des domaines aussi variés que la médecine, le contrôle qualité des industries agro-alimentaires ou la prospection environnementale. Si certains concepts semblent parfois ne pas dépasser ce stade, comme l'utilisation de Nb fusionnés à la peroxydase comme agents cibles de taches dans les lessives (Joosten *et al*, 2005), de nombreuses applications nouvelles sont proposées chaque jour pour tirer profit des caractéristiques remarquables des Nb.

Dans le domaine de l'agriculture, des Nb spécifiques de plantes (Jongedijk *et al*, 2011) ou d'insectes (Jongedijk *et al*, 2013) ont été récemment développés par la start-up belge *Agrosavfe* dans le but de retenir les intrants phytosanitaires au niveau des plantes et ainsi réduire les quantités nécessaires. Ces Nb se fixent par exemple aux trichomes, aux stomates ou à la surface des feuilles ou des aphides. Ils sont associés à des "agrocapsules" contenant les substances actives qui sont alors libérées de façon plus spécifique et contrôlée (De Meyer *et al*, 2014).

Les possibilités de modification à façon des Nb, encouragent les développeurs à les adapter aux techniques biologiques émergentes. Des chercheurs de l'université de Davis (Californie, Etats-Unis) ont par exemple proposé récemment un système microfluidique d'analyse biomoléculaire portable (*lab-on-a-chip*) basé sur l'utilisation combinée de Nb et d'un smartphone (Chen *et al*, 2014).

En raison notamment de leur grande stabilité on peut s'attendre à ce que leur usage se répande rapidement jusque dans des applications encore insoupçonnées. En alliant les possibilités du génie génétique et les méthodes les plus inventives de sélection, les possibilités de les décliner semblent en effet sans limite et il y a fort à parier que dans un avenir proche les Nb envahiront notre quotidien.

Objectifs du travail de thèse

Au début de ce projet, plusieurs avancées majeures venaient d'être accomplies dans la compréhension des mécanismes de la transmission des népovirus par leurs nématodes vecteurs. Il était déjà clairement établi que la spécificité de transmission du GFLV est uniquement déterminée par sa protéine de capsid (Andret-Link *et al*, 2004b) et il a été montré par la suite qu'il en est de même pour l'ArMV (Marmonier *et al*, 2010), mais les bases moléculaires de cette spécificité restaient et demeurent encore à ce jour imprécises.

Lors du travail de thèse précédant cette étude, deux motifs importants pour la transmission du GFLV par *X. index* ont été isolés par mutagenèse dirigée et analyse fonctionnelle de la série de mutants générés. Le premier déterminant consiste en une suite de onze résidus contigus (Phe₁₈₈-Lys₁₉₈) situés dans une région exposée de la capsid (Schellenberger *et al*, 2010). Le second se limite à un seul acide aminé (Gly₂₉₇) identifié par la caractérisation du variant GFLV-TD, faiblement transmissible, qui ne diffère du GFLV sauvage que par la mutation Gly₂₉₇Asp n'affectant ni la conformation de la capsid ni les interactions entre ses sous-unités protéiques (Schellenberger *et al*, 2011). La résolution de la structure atomique du GFLV sauvage à 3 Å et du GFLV-TD à 2,7 Å a été une étape décisive qui a permis de révéler l'organisation de ces deux motifs en deux boucles localisées en périphérie d'une cavité de 20 Å de diamètre, exposée au solvant et chargée positivement.

En combinant audacieusement des approches expérimentales de biologie structurale avec des techniques classiques de génétique fonctionnelle, les travaux de thèse précédents ont ainsi délimité en surface de la capsid du GFLV une zone structurale susceptible de correspondre au site d'interaction avec un récepteur chez son vecteur *X. index*. Les objectifs de poursuite de l'étude étaient alors tout définis, il fallait s'appuyer sur la dynamique de ces résultats remarquables pour élucider la fonction précise de la cavité et en détailler les résidus directement impliqués dans la transmission, en conservant la volonté, fondement des succès précédents, de tirer parti des perspectives apportées par des domaines de recherche transversaux généralement négligés par la virologie végétale.

Parmi les différentes techniques disponibles pour cartographier les interactions entre un récepteur et son ligand ou *epitope mapping*, une approche de *phage display* avec utilisation de peptides de synthèse et d'anticorps monoclonaux neutralisants est souvent choisie en raison de sa facilité de mise en œuvre par rapport aux approches structurales de cristallographie, de résonance magnétique nucléaire ou de cryomicroscopie électronique qui sont plus longues, lourdes et onéreuses et dont l'issue est plus aléatoire.

L'idée originale de ce projet réside dans la mise à profit de la technologie Nanobody, en pleine expansion et largement valorisée en santé humaine depuis presque vingt ans, mais restée jusque-là confidentielle en biologie végétale. Les Nb présentent un répertoire antigénique comparable aux immunoglobulines classiques, en termes d'affinité et de diversité, mais ont l'avantage d'être de taille plus réduite, de posséder une structure monomérique, deux critères particulièrement adaptés au *phage display* et de reconnaître préférentiellement des épitopes conformationnels concaves.

L'objectif initial était d'identifier des Nb dirigés contre la cavité ou discriminants entre des virus transmis et non transmis par *X. index* puis d'en déterminer la structure et de dresser une cartographie à

Objectifs

l'échelle atomique de l'ensemble des résidus susceptibles de participer à l'interaction virus/vecteur. Leur utilisation pour mettre en évidence cette interaction au niveau du nématode et l'évaluation de leur effet compétiteur sur la reconnaissance virus/vecteur étaient également envisagées pour permettre *in fine* la caractérisation du récepteur chez *X. index* et l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre le court-noué basées sur l'inhibition de la transmission.

La première partie de ma thèse a été essentiellement consacrée au développement de "l'outil Nanobody". Grâce à une collaboration initiée avec Serge MUYLDERMANS, co-inventeur des Nb, et suite à un séjour de deux mois au *Nanobody Service Facility* (NSF) du *Vlaams Instituut voor Biotechnologie* (VIB) à Bruxelles, une collection de 23 Nb reconnaissant spécifiquement la capsid du GFLV a été obtenue (cf Chapitre 3 : Obtention d'une collection de Nanobodies reconnaissant le GFLV). Leur caractérisation partielle a révélé des différences d'affinité et de reconnaissance d'épitopes et a confirmé qu'au moins l'un d'entre eux, le Nb 122, qui montre une forte affinité pour le GFLV sauvage mais ne reconnaît pas le GFLV-TD reconnaît, comme espéré, la région de la cavité.

Dans un deuxième temps il s'est agi de se familiariser avec ce nouvel outil, jusqu'alors non utilisé en virologie végétale, afin d'en appréhender toutes les potentialités. À partir de là, le champ d'application prévu des Nb s'est rapidement et considérablement élargi. Ils ont été fusionnés à une protéine fluorescente pour générer des Chromobodies (Cb) qui, exprimés transitoirement, se sont avérés fonctionnels en plante et des plants de *Nicotiana benthamiana* transgéniques les exprimant de façon constitutive ont été produits. En expression transitoire ou stable, les Cb se sont révélés être des biocapteurs efficaces qui rendent possible le suivi spatio-temporel des particules virales dans leur hôte (cf Chapitre 5 : Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV) ce qui était jusque-là impossible. Ce suivi dynamique est tangible dans différents tissus y compris les tissus racinaires, ouvrant la voie à l'étude des étapes de primo-infection du GFLV lors de l'inoculation par nématode.

La transformation de *N. benthamiana* avec le Nb23 a cependant conduit à une inhibition remarquable de la multiplication du GFLV. L'étude des propriétés antivirales des Nb a par conséquent accaparé toute la fin de ma thèse à travers l'analyse du comportement de deux lignées homozygotes exprimant le Nb23 face à l'infection (cf Chapitre 4 : Les Nanobodies induisent de la résistance au GFLV). Une des lignées présente une immunité totale vis-à-vis d'une large gamme d'isolats du GFLV et dans différentes méthodes d'inoculation, mais qui est surmontée dans le cas d'une forte pression d'inoculum. Ce contournement a été directement relié à l'apparition de mutations situées en bordure de la cavité qui réduisent l'affinité du Nb 23 pour la capsid. La structure du Nb 23 complexé au GFLV sauvage a été obtenue par cryomicroscopie électronique en collaboration avec l'équipe de Bruno KLAHOLZ de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch et confirme que l'épitope du Nb23 surplombe la cavité et chevauche le site des mutations. Enfin, l'objectif de départ qui visait, par le biais des Nb, à étudier la transmission du GFLV a fini par être rattrapé avec la mise en évidence de la perte complète de la transmissibilité par *X. index* du mutant contournant majoritaire renforçant ainsi l'intérêt biotechnologique majeur des Nb dans la proposition de solutions nouvelles et durables pour combattre le court-noué. Le mécanisme sous-jacent de la résistance reste à découvrir mais des expériences préliminaires ont démontré qu'il intervient en amont du mouvement du virus de cellule à cellule.

L'ensemble des résultats de ces travaux démontrent que les Nb, qui étaient destinés à ne servir que de simple outil moléculaire ponctuel, constituent en réalité une approche à haute valeur ajoutée pour l'étude des mécanismes de mouvement et de transmission d'un virus de plante et offrent des possibilités uniques dans la lutte contre le court-noué de la vigne.

Chapitre 3

Obtention d'une collection de Nanobodies reconnaissant le GFLV

1 Développement de Nanobodies

1.1 Des anticorps recombinants faciles à obtenir

Au-delà de leurs propriétés biophysiques exceptionnelles, l'attrait pour les Nb réside dans leur facilité d'obtention par une succession de procédés éprouvés, économiques et flexibles (Ghassabeh *et al*, 2010; Vincke *et al*, 2012). La démarche se résume usuellement à l'immunisation d'un dromadaire (*Camelus dromedarius*) ou d'un lama (*Lama glama*), plus marginalement d'un chameau (*Camelus bactrianus*) (Tillib *et al*, 2014), d'un alpaga (*Vicugna pacos*) (Tarr *et al*, 2013) ou d'un requin (*Ginglymostoma cirratum*) (Goodchild *et al*, 2011), puis au clonage de l'ensemble du répertoire V_HH à partir des lymphocytes sanguins périphériques, à la sélection *in vitro* de V_HH spécifiques de l'antigène d'intérêt, à leur production à haut rendement par expression hétérologue et à leur purification à homogénéité par chromatographie [Figure 3.1]. Le processus complet de sélection d'un Nb peut sans peine être achevé en moins de trois mois à compter de la première injection (Desmyter *et al*, 2015).

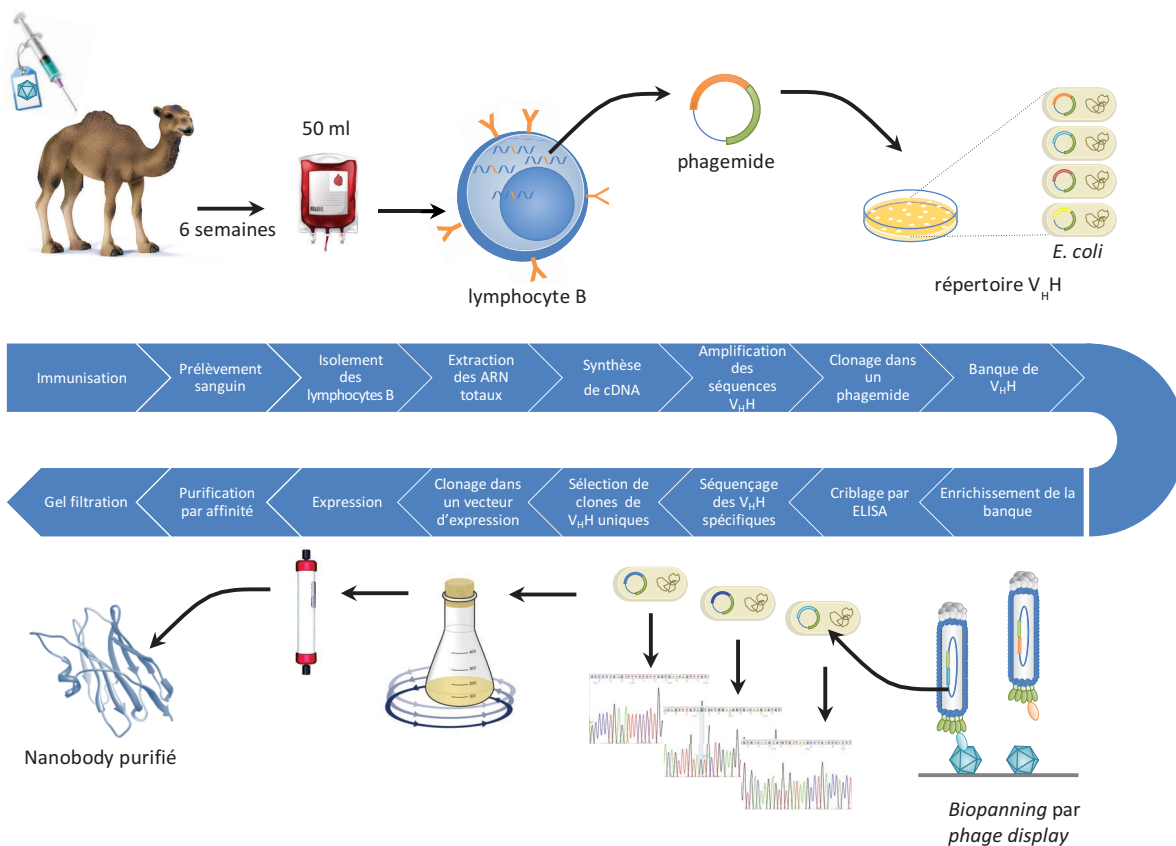


Figure 3.1 | Vue d'ensemble des différentes étapes de la procédure classique d'obtention d'un Nb.

Figure 3.1 | Vue d'ensemble des différentes étapes de la procédure classique d'obtention d'un Nb.

Environ six semaines après immunisation d'un camélidé par injections sous cutanées répétées d'un antigène ou d'un cocktail d'antigènes purifiés, un prélèvement sanguin est effectué. Les lymphocytes B sont isolés du sang, puis lysés pour en extraire les ARN totaux comprenant les mRNA codant pour les IgG. Après synthèse de cDNA par transcription inverse, les séquences correspondant aux Nb sont clonées dans un phagemide pour générer une banque susceptible de représenter toute la diversité du répertoire d'anticorps à chaînes lourdes de l'animal. Cette banque est enrichie (biopanning) par phage display en séquences dirigées contre l'antigène d'intérêt et des clones spécifiques uniques sont sélectionnés par ELISA et identifiés par séquençage. Les clones choisis sont ensuite sous-clonés dans un vecteur d'expression et les Nb sont produits le plus souvent dans *E. coli* puis purifiés à homogénéité par une chromatographie d'affinité suivie généralement par une chromatographie d'exclusion de taille.

1.1.1 Immunisation

Les procédures utilisées pour générer des anticorps à chaînes lourdes (*Heavy chain only antibodies*, HCAb) chez les *Camelidae* sont analogues à celles qui sont utilisées depuis des décennies pour générer des anticorps conventionnels chez d'autres mammifères. Classiquement, une injection sous-cutanée initiale de l'antigène mélangé à un adjuvant vaccinal, suivie de plusieurs rappels avec ou sans adjuvant est suffisante pour induire des titres élevés de HCAb. La répétition des administrations immunogènes produit une réactivation régulière du système immunitaire et stimule l'hypermutation somatique dans le but d'enrichir le répertoire immunitaire du camélidé en anticorps spécifiques possédant des séquences, des propriétés et des affinités plus variées. Pour réduire les coûts liés à l'immunisation, il est courant d'injecter à un animal un cocktail comprenant jusqu'à une vingtaine d'antigènes différents et l'animal peut être réemployé avec succès pour d'autres projets d'obtention de Nb à la condition de respecter une période de repos d'au moins six mois (Pardon *et al*, 2014).

Le recul acquis en près de vingt ans d'expérience a prouvé qu'il est possible d'obtenir ainsi des Nb contre *a priori* n'importe quelle protéine correctement repliée, voire, mais plus difficilement, contre des haptènes tels que des colorants azoïques (Spinelli *et al*, 2000), des mycotoxines (Liu *et al*, 2015; He *et al*, 2014), la caféine (Ladenson *et al*, 2006) ou encore le trinitrotoluène (TNT) (Anderson & Goldman, 2008). Bien que plusieurs publications décrivent l'obtention de Nb spécifiques d'antigènes immuno-dominants après immunisation avec des extraits cellulaires non purifiés (lysats de trypanosomes (Saerens *et al*, 2008), extraits bruts de graines d'*Arabidopsis thaliana* (De Meyer *et al*, 2013), venin de cobra (Richard *et al*, 2013), transfusion de sang humain (Habib *et al*, 2013)...), la qualité de l'antigène utilisé pour l'immunisation est néanmoins de première importance et conditionne souvent l'issue favorable d'un projet. Une stratégie par immunisations alternées, censée favoriser la sélection de Nb avec des réactivités croisées, n'a pas, dans le cas du développement de Nb contre le virus de la vaccine par exemple, conduit comme attendu à l'obtention de Nb capables de reconnaître à la fois la particule virale inactivée et sa protéine membranaire L1 recombinante purifiée, vraisemblablement en raison de la faible qualité de la préparation virale utilisée lors de la première injection (Walper *et al*, 2014).

On peut noter, comme en témoigne le grand nombre de publications déjà parues (Eyer & Hruska, 2012), que l'immunisation de camélidés et en particulier la taille et l'exotisme de ces animaux n'ont étonnamment pas été un frein à la génération d'une grande variété de Nb et à leur exploitation pour diverses applications. En vue de rationaliser les procédures d'obtention de Nb thérapeutiques, l'utilisation de lignées de souris transgéniques synthétisant des HCAb humanisés est cependant à l'étude (Janssens *et al*, 2006). Ce concept est d'ores et déjà proposé par la société *Harbour Antibodies* (Craig *et al*, 2014), mais sa réalité comme source de Nb performants reste encore à démontrer avant d'envisager une substitution totale ou partielle des camélidés par cette approche (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al*, 2013).

1.1.2 Clonage du répertoire simple chaîne

Un échantillon de 50 à 100 ml de sang (soit moins de 0,2 % de la volémie, c'est-à-dire moins de 10 ml à l'échelle humaine) contient suffisamment de lymphocytes B pour constituer une banque représentant un ensemble diversifié de Nb avec une haute affinité pour leur antigène associé. Les ARN totaux sont idéalement purifiés aussitôt après prélèvement à partir des lymphocytes B isolés du sang non coagulé puis rétro-transcrits en ADN complémentaire (*complementary DNA*, cDNA), le plus souvent à l'aide d'amorces universelles ciblant les ARN messagers (*messenger RNA*, mRNA).

Les V_HH étant codés par des exons uniques qui possèdent des bordures homologues du fait de leur appartenance à une même famille génique, la totalité du répertoire Nb d'un animal peut en théorie être directement amplifiée par PCR avec une simple paire d'amorces puis immédiatement clonée (Kastelic *et al*, 2009). En pratique, la stratégie de clonage standard consiste en deux PCR imbriquées successives avant ligation dans un vecteur adéquat [Figure 3.2] (Ghassabeh *et al*, 2010). Cette précaution permet d'éviter l'introduction dans la banque de séquences V_H qui ont naturellement tendance à adhérer de manière aspécifique en raison de l'exposition de résidus hydrophobes conservés, absents des séquences V_HH . Un soin particulier doit être apporté à chaque étape pour s'assurer de préserver au maximum la diversité de la future banque (amélioration des rendements de PCR, multiplication des tubes de réaction, limitation du nombre de cycles d'amplification...).

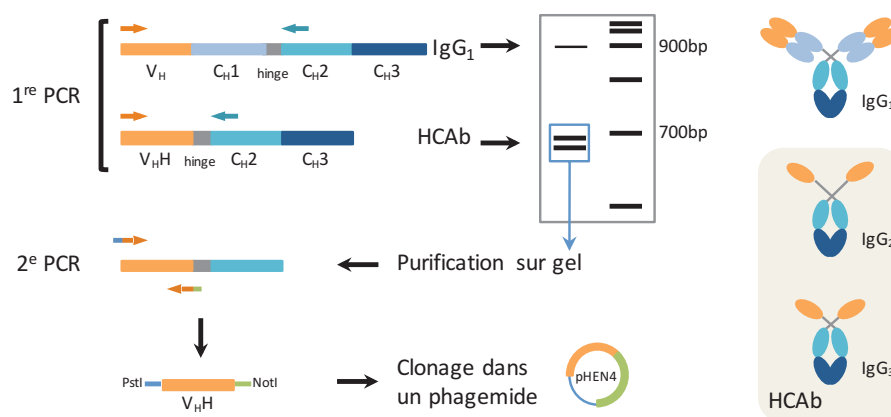


Figure 3.2 | Stratégie de clonage des Nb.

Pour amplifier les séquences codant pour les V_HH , deux PCR successives sont réalisées à partir des cDNA représentant l'ensemble des IgG des lymphocytes B du caméléidé immunisé. La première PCR utilise des amorces s'hybridant avec des séquences conservées parmi tous les isotypes d'IgG de caméléidés et amplifie une région située entre le domaine constant C_H2 et la séquence leader des domaines variables V_H et V_HH . Elle permet d'isoler, après simple séparation sur gel d'agarose, les fragments amplifiés à partir des anticorps conventionnels (IgG1) des fragments amplifiés à partir des anticorps chaînes lourdes (HCAb), ces derniers étant plus petits en raison de l'absence du domaine constant C_H1 . Des fragments encore plus courts correspondant aux seules séquences V_HH sont ensuite générés lors d'une deuxième PCR qui introduit des sites de restriction facilitant le clonage orienté dans un phagemide dans le but d'obtenir une banque de phagemides représentant l'entière diversité du répertoire HCAb.

Contrairement aux banques combinatoires de fragments d'anticorps conventionnels où les paires originelles de domaines V_H et V_L formant le site de liaison à l'antigène sont séparées puis réarrangées au hasard lors du clonage, la nature simple chaîne des Nb préserve la spécificité native des anticorps dont ils dérivent et permet de tirer pleinement parti de la réponse humorale générée contre l'antigène cible. Grâce à la prolifération des lymphocytes B induite par l'immunisation, la construction de banques de plus de 10^7 clones indépendants ne s'avère généralement pas nécessaire et des Nb présentant

d'excellents paramètres d'affinité avec des constantes de dissociation subnanomolaires sont régulièrement obtenus à partir de banques immunes d'environ 10^6 clones indépendants (Saerens *et al*, 2004).

Depuis quelques années, des banques dites naïves ont été développées de la même façon mais à partir de sang de plusieurs animaux, appartenant à une seule espèce (lama (Monegal *et al*, 2009; Saerens & Muyldermans, 2012), requin (Liu *et al*, 2007b), alpaga (Tu *et al*, 2012), chameau (Yan *et al*, 2015; Skottrup *et al*, 2011)) ou à plusieurs espèces différentes (lama, alpaga et chameau (Kumaran *et al*, 2012)), qui n'ont pas été immunisés. En s'appuyant sur la diversité naturelle du répertoire primaire et passif, ces banques permettent d'isoler en seulement trois semaines (Desmyter *et al*, 2015) des Nb spécifiques de virtuellement n'importe quelle molécule. En revanche, elles doivent être de taille plus importante (10^8 à 10^{11} clones) et un processus de maturation *in vitro* doit être fréquemment appliqué pour obtenir des Nb d'affinité suffisante pour convenir à la plupart des applications. Alternativement des banques semi-synthétiques et synthétiques sont construites *in vitro* par la redistribution (Goldman *et al*, 2006) ou la mutagénèse aléatoire (Liu *et al*, 2007a; Yan *et al*, 2014) de tout ou partie des CDR de l'ensemble des Nb d'une banque naïve ou d'une seule charpente protéique de base thermodynamiquement stable (Saerens *et al*, 2005; Shao *et al*, 2007). Cette dernière stratégie est parfois combinée au greffage dans un des CDR d'un *binding peptide* connu, comme cela a été effectué par une équipe japonaise pour concevoir un Nb capable de reconnaître l'or (Hattori *et al*, 2012).

Outre leurs avantages évidents en termes de coût et de rapidité de mise en œuvre, ces approches non-immunes se révèlent particulièrement intéressantes pour pallier l'incompatibilité avec l'immunisation d'agents transmissibles, létaux, instables *in vivo* ou encore à faible pouvoir antigénique. Dans la mesure du possible, il est toutefois généralement préférable de recourir à un répertoire qui a été confronté à l'antigène cible. L'analyse par *deep sequencing* de la réponse immunitaire de lamas contre le Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) a par exemple montré que les Nb neutralisants identifiés au cours de l'étude dérivait tous de lignées de HCAB élicitées par l'immunisation (McCoy *et al*, 2014). De même, dans le cas de Nb dirigés contre la principale neurotoxine du venin de cobra, seuls les Nb obtenus après immunisation se sont révélés neutralisants alors que ceux isolés auparavant à partir d'une banque naïve présentaient une affinité trop faible (1000 fois inférieure à celle des précédents) pour conférer une protection *in vivo* efficace (Richard *et al*, 2013).

1.1.3 Sélection des Nb

Engager des efforts considérables pour se doter de banques larges et complexes ne présente qu'un intérêt très relatif si on ne dispose pas d'un système performant pour sélectionner par après des Nb spécifiques de l'antigène ciblé. Le développement des techniques de présentation de protéines recombinantes à la surface de différents organismes a constitué une avancée majeure qui a rendu possible le criblage extensif d'un grand nombre de candidats. Le concept original, élaboré avec le phage M13 (*phage display*) (Smith, 1985), repose sur le lien physique maintenu tout au long du processus de criblage entre les propriétés de reconnaissance d'un peptide exprimé à la surface d'un phage (phénotype) et l'information génétique correspondant au dit peptide contenue dans ce même phage (génotype). Ce principe de base, commun à tous les systèmes de présentation, permet ainsi d'isoler simultanément une protéine douée d'affinité pour un ligand donné et sa séquence codante.

Le phage M13 est un bactériophage filamenteux infectant spécifiquement les souches à Gram négatif porteuses du facteur F codant pour la synthèse des pili sexuels qui lui tiennent lieu de récepteurs. Les particules virales sont composées d'un génome ADN simple brin circulaire de 6,4 kb encapsidé par

un assemblage hélicoïdal d'environ 2700 copies de la protéine majeure de capsid (pVIII), fermé d'un côté par cinq exemplaires de deux protéines mineures de capsid (pVII et pIX) et de l'autre côté par cinq exemplaires de deux autres protéines mineures de capsid (pVI et pIII) [Figure 3.3]. La longueur des particules, de l'ordre de 900 nm pour un diamètre de 6-7 nm, s'ajuste à la taille de l'ADN phagique offrant ainsi l'opportunité technologique d'insérer des séquences exogènes dans des régions non essentielles du génome sans en perturber l'encapsidation. Au cours d'un cycle infectieux naturel, le phage se fixe via pIII à l'extrémité du F-pilus de *E. coli* dont la rétraction qui s'ensuit ramène la particule virale au contact de la membrane externe de la bactérie. Le phage transfère alors son génome simple brin dans le cytoplasme de la cellule où il est converti par une polymérase de l'hôte en une forme répliquative double-brin circulaire qui sert de matrice pour sa répliquation et pour l'expression des différentes protéines virales. La reconnaissance du signal d'encapsidation, constitué par une structure en tige-boucle exposée sur l'ADN simple brin néo-synthétisé, initie l'assemblage des nouvelles particules au niveau de la membrane cytoplasmique. Ce processus est non lytique et conduit à la sécrétion des phages dans le milieu de culture à partir duquel ils peuvent être directement récupérés par une simple étape de précipitation au polyéthylène glycol.

Dans le système du *phage display*, le répertoire de peptides à exposer est exprimé en fusion avec le domaine N-terminal d'une des cinq protéines de capsid du phage M13 qui se prêtent toutes à des degrés divers à la présentation de peptides (Clackson & Lowman, 2004). Cependant, pIII est préférentiellement exploitée car sa structure tolère de grandes insertions sans engendrer d'encombrements stériques significatifs. Le système a été amélioré par le développement de phagemides qui combinent, dans un vecteur de taille réduite, les avantages du génome d'un phage et ceux d'un plasmide classique. Ils comprennent une origine de répliquation phagique pour permettre la synthèse d'ADN simple-brin apte à être encapsidé au même titre qu'un génome sauvage, mais possèdent également une origine de répliquaction bactérienne pour permettre leur propagation dans *E. coli* [Figure 3.3]. Les séquences correspondant aux peptides à exposer sont insérées dans le phagemide de façon à conserver la phase entre un signal de sécrétion et le gène codant pour pIII. La fusion est en général séparée par un codon stop ambre ce qui conduit, dans une souche *E. coli* suppressive de codon ambre, au maximum, à l'expression de la moitié des peptides sous forme fusionnée (Clackson & Lowman, 2004), tout en maintenant la possibilité d'exprimer uniquement la forme non fusionnée dans une souche non suppressive. Le phagemide est incapable d'induire à lui seul la formation de particules, pour ce faire, l'intervention d'un phage auxiliaire (phage *helper*) capable de fournir en *trans* le reste des gènes viraux est nécessaire. Le phage *helper* contient le génome complet d'un phage sauvage mais comporte dans son origine de répliquaction une mutation qui compromet son encapsidation de sorte que sur dix particules formées, neuf contiennent le phagemide. Le recours à un phage *helper* codant pour une version sauvage de pIII permet de plus de s'assurer de ne pas altérer les capacités d'infection des phages grâce à la production de particules chimères ne comportant qu'une ou deux copies de pIII fusionnées.

L'autre atout du *phage display* est de pouvoir cribler simplement et rapidement les Nb exposés au moyen d'une procédure d'enrichissement par affinité appelée *biopanning* en référence au lavage à la batée (*pan* en anglais) pratiqué en orpaillage. Au cours de cycles répétés de capture, de lavages, d'éluion et d'amplification, les phages sont retenus pour leur aptitude à se lier avec l'affinité la plus forte à l'antigène d'intérêt qui est généralement immobilisé sur une surface solide [Figure 3.3]. Après quelques cycles et un enrichissement significatif de la banque en phages possédant les caractéristiques recherchées, les clones sont criblés individuellement et les Nb sélectionnés sont identifiés par séquençage des phagemides correspondants. Toute la puissance du *phage display* réside dans la

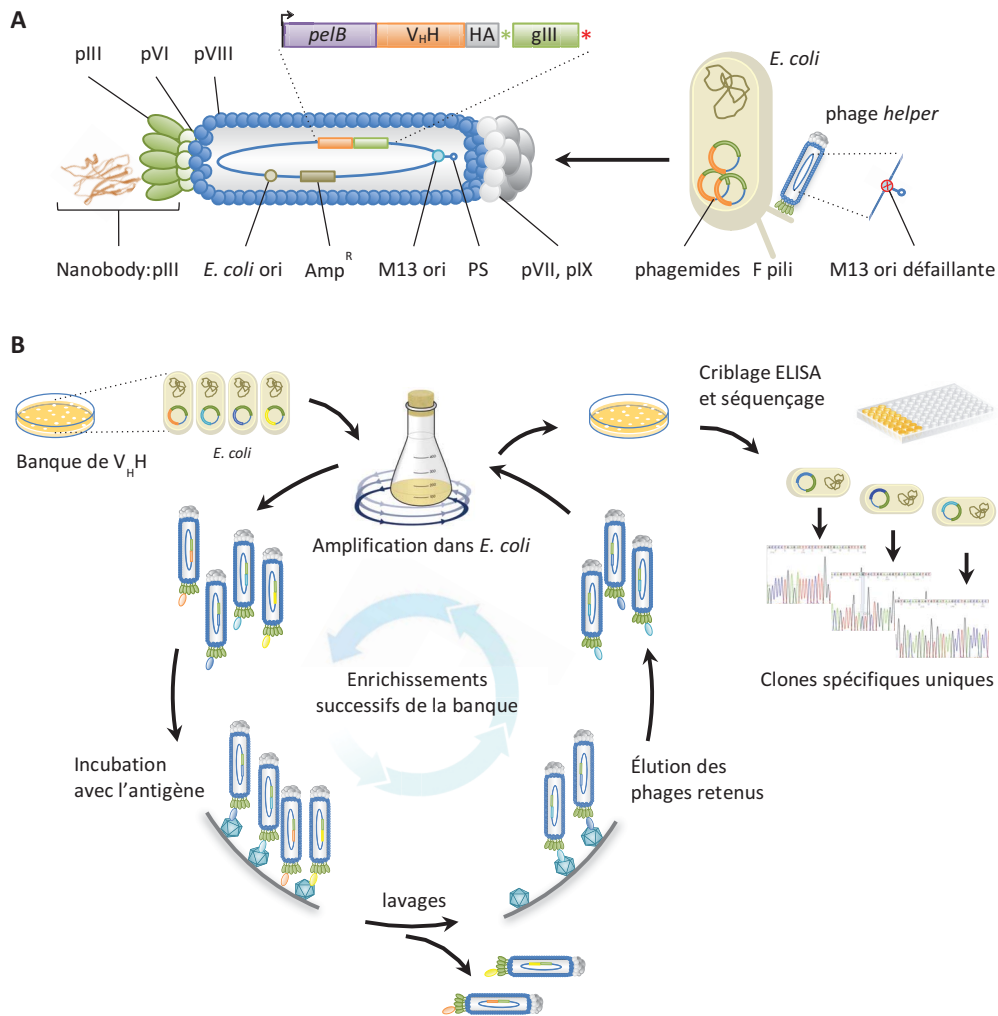


Figure 3.3 | Principe du biopanning par phage display.

A. Le *phage display* permet de lier physiquement le phénotype d'un peptide à son génotype. Dans ce système, le génome d'ADN simple brin circulaire du bactériophage M13 est remplacé par un phagemide, autorépliquatif dans la bactérie, mais dépourvu des fonctions virales nécessaires à la formation de particules virales. Les séquences codant pour les V_HH y sont clonées en phase avec le gène *gIII* qui code pour la protéine de capsid mineure *pIII* du phage. Lors d'une infection avec un phage *helper* dont l'origine de réplication est mutée pour limiter l'encapsidation de son génome, les virions produits exposent la protéine de fusion $V_HH:pIII$ à une des extrémités de leur structure filamenteuse sans perdre leur infectivité subordonnée à la reconnaissance, par *pIII*, des F-pili d'*E. coli*. Un codon stop ambre, situé en aval des séquences codant pour les V_HH , permet également l'export vers le périplasme, par le biais d'un peptide signal *pelB*, de V_HH non fusionnés détectables grâce à la présence d'un *HA-tag*.

pelB : séquence d'export périplasmique dérivée du gène codant pour la pectate lyase B de *Pectobacterium carotovorum* ; *HA* : séquence dérivée du gène codant pour l'hémagglutinine du Human influenza virus ; astérisque vert : codon stop ambre (TGA) ; *gIII* : gène codant pour *pIII* ; astérisque rouge : codon stop ocre (TAG) ou opale (TAA) ; *pIII*, *pVI*, *pVII*, *pIX* : protéines mineures de capsid ; *pVIII* : protéine majeure de capsid ; *E. coli ori* : origine de réplication bactérienne ; *Amp^R* : gène de résistance à l'ampicilline ; *M13 ori* : origine de réplication phagique ; *PS* : signal d'encapsidation (*packaging signal*).

B. Une banque d'*E. coli* contenant des phagemides représentant l'ensemble d'un répertoire V_HH est enrichie en V_HH spécifiques d'un antigène d'intérêt par cycles successifs de sélection par affinité sur surface solide faisant intervenir une étape phage (*biopanning*). Les phages, produits suite à l'infection avec un phage *helper* de la banque mise en culture, sont incubés avec l'antigène cible. Les phages retenus après plusieurs lavages sont élués à pH basique et utilisés pour infecter une nouvelle culture bactérienne qui servira soit à réaliser un nouveau cycle d'enrichissement, soit à identifier par séquençage les gènes codant pour les V_HH sélectionnés après criblage par ELISA.

souplesse d'exécution du *biopanning*, les conditions dans lesquelles il est réalisé (température, pH, stringence des lavages, présence de compétiteurs ou d'agents dénaturants...) pouvant être précisément adaptées aux futures conditions d'utilisation des Nb. Des Nb capables de reconnaître le champignon *Malassezia furfur* impliqué dans le développement des pellicules, en présence de concentrations élevées de tensioactifs, ont par exemple été isolés par un *biopanning* effectué avec un tampon contenant jusqu'à 40 % de shampoing (Dolk *et al*, 2005).

Trente ans après la première description du *phage display*, le phage M13 est toujours le modèle de présentation d'une banque de protéines le plus utilisé en raison de son petit génome facilement manipulable et de l'efficacité de la machinerie virale qui produit de grandes quantités de matériel adaptées au criblage de larges répertoires. Le système n'est pas pour autant resté figé dans le temps, mais a constamment été optimisé et a servi de base pour la conception de nombreux autres modèles de présentation. Pour simplifier la sélection des Nb, le principe du *NanoPad* (Fraile *et al*, 2013) repose par exemple sur la possibilité de retenir les phages à partir du transfert sur membrane d'un mélange complexe séparé par électrophorèse sans avoir à recourir à un antigène purifié. Le principe du *transdisplay* (Sherwood & Hayhurst, 2012) consiste à fusionner un noyau streptavidine à pIII pour pouvoir fixer un Nb biotinylé *in vivo* exprimé à partir d'un autre plasmide afin d'obtenir, sans clonage supplémentaire, un format de Nb prêt à l'emploi à des fins de diagnostic. Alternativement, la présentation à la surface de bactéries à Gram positif (*Staphylococcus carnosus display* (Fleetwood *et al*, 2013)) ou de levures (*Pichia pastoris display* (Ryckaert *et al*, 2010)) met à profit la grande taille des cellules pour permettre en temps réel une sélection fine des Nb par cytométrie en flux (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Quant aux systèmes de présentation acellulaires (*mRNA/cDNA display* (Doshi *et al*, 2014), *ribosome display* (Bencurova *et al*, 2015)), leur intérêt réside dans la taille des banques qui, n'étant plus limitée par l'efficacité de transformation de cellules, donne accès à des répertoires de très grande taille pouvant aller au-delà de 10^{14} clones indépendants, gage d'une diversité indispensable pour l'exploitation de banques naïves.

Les enjeux futurs des Nb poussent au développement de méthodes permettant l'identification de Nb plus faiblement représentés et préférentiellement fonctionnels dans le cytoplasme (Pellis *et al*, 2012; Matz *et al*, 2014) avec un rendement élevé par le biais notamment de techniques de séquençage à haut débit (Miyazaki *et al*, 2015; Fridy *et al*, 2014).

1.1.4 Production et purification

La viabilité de la plupart des applications des Nb dépend directement de la capacité à les produire en grande quantité et de façon fiable et rentable. Or la simplicité et la robustesse des Nb se sont avérées extrêmement favorables à leur production en masse qui a été validée dans de nombreux organismes différents (De Meyer *et al*, 2014).

La majorité des Nb sont produits dans le périplasme d'*E. coli* où ils sont exprimés à moindre coût sous forme soluble et non agrégée à des niveaux bien supérieurs à ceux qu'il est généralement possible d'obtenir pour des fragments d'anticorps conventionnels. Les rendements moyens varient de 1 à 10 mg par litre de milieu de culture et peuvent occasionnellement dépasser 70 mg/l (Hussack *et al*, 2011). En expression cytoplasmique, les rendements atteignent plus couramment 100 à 200 mg/l mais la formation de Nb fonctionnels est alors limitée par l'environnement réducteur du cytoplasme, à moins de procéder à une stabilisation moléculaire préalable des Nb (Li *et al*, 2012), à leur coexpression avec des protéines chaperonnes (Olichon & Surrey, 2007) ou à l'utilisation de souches mutantes d'*E. coli* présentant un cytoplasme moins réducteur (Zarschler *et al*, 2013; Habib *et al*, 2013).

L'expression en levures (*Saccharomyces cerevisiae* (Thomassen *et al*, 2002) et *Pichia pastoris* (Rahbarizadeh *et al*, 2006)), voire parfois dans d'autres ascomycètes (*Aspergillus awamori* (Joosten *et al*, 2005) et *A. oryzae* (Okazaki *et al*, 2012)), tire profit des voies de sécrétion des eucaryotes inférieurs pour la formation efficace des ponts disulfures et l'accumulation de Nb solubles et correctement repliés directement dans le milieu de culture. Bien que sujets à de fortes variations, les rendements obtenus en levures sont jusqu'à six fois plus élevés qu'en bactéries pour un même Nb (Ezzine *et al*, 2012). En revanche, ces Nb subissent des glycosylations qui peuvent affecter leurs propriétés de liaison à l'antigène et augmenter leur immunogénicité entravant leur application médicale. Les levures restent cependant très avantageuses pour produire, sans risque de contamination par des endotoxines bactériennes, des formats de Nb difficiles à obtenir en bactéries. Ce système d'expression est de surcroît aisément transposable à des procédés de fermentation à grande échelle et permet alors d'approcher des rendements de l'ordre du g/l (Frenken *et al*, 2000).

Les cellules animales, qui constituent pourtant l'hôte préférentiel pour la synthèse industrielle d'anticorps thérapeutiques, n'ont été que très peu exploitées pour la synthèse de Nb. Le recours à une lignée de cellules CHO (chinese hamster ovary cells) s'est toutefois révélé intéressant pour obtenir avec un rendement de 100 mg/l, des Nb fusionnés à une région Fc avec des modifications post-traductionnelles compatibles avec un usage thérapeutique (Agrawal *et al*, 2012).

Malgré les avancées des biotechnologies végétales et l'essor grandissant du *molecular farming*, la production de Nb en plantes est encore peu documentée par rapport aux autres systèmes d'expression (Marconi & Alvarez, 2014). Des niveaux d'accumulation de Nb atteignant 5 % des protéines solubles totales (*total soluble proteins*, TSP) ont été décrits dans des cultures cellulaires de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Barrera *et al*, 2015), mais sauf rares exceptions (Ismaili *et al*, 2007; Teh & Kavanagh, 2009), ils restent globalement inférieurs à 1 % des TSP dans des plantes entières. Les capacités de production de ces dernières sont néanmoins théoriquement considérables sans gros investissements puisqu'elles ne dépendent essentiellement que des surfaces mises en cultures. Les rendements peuvent de plus être améliorés par la fusion à des partenaires stabilisateurs comme la β -glucuronidase pour une expression jusqu'à 3 % des TSP dans les chloroplastes de feuilles de tabac (Lentz *et al*, 2012) ou comme une région Fc pour une expression jusqu'à 16 % des TSP dans des graines d'*A. thaliana* (De Buck *et al*, 2013). La comparaison de l'expression d'un même set de Nb dans *P. pastoris*, dans des feuilles de *N. benthamiana* et dans des graines d'*A. thaliana* suggère que les niveaux d'accumulation sont essentiellement déterminés par la séquence codante du Nb et sont difficilement extrapolables d'un système de production à un autre (De Meyer *et al*, 2015). Le choix du système le plus approprié, loin d'être universel, doit donc être évalué au cas par cas et selon l'application finale envisagée.

La création de cellules végétales "humanisées", dont le système de N-glycosylation a été modifié pour améliorer leur tolérance chez l'homme, place les plantes au rang de plateforme à très haut potentiel pour la production de Nb à visée thérapeutique en raison de sa rentabilité, de sa garantie de sécurité sanitaire élevée et de sa flexibilité qui la rend propice à l'innovation. Une méthode innovante utilisant un vecteur viral dérivé du *Tobacco mosaic virus* (TMV) et basée sur le principe d'exclusion de surinfection d'une cellule de *N. benthamiana* par le TMV (Julve *et al*, 2013) a récemment été proposée pour générer facilement, dans une seule plante, un mélange équilibré de plusieurs Nb différents baptisé "plantiserum" en référence aux sérums d'anticorps polyclonaux conventionnels (Orzáez *et al*, 2014). L'expression dans les graines ouvre, quant à elle, des perspectives attrayantes en matière de stockage et de mode de distribution des Nb. Des porcelets ont par exemple été protégés de toxi-infections liées à *E. coli* suite à

une alimentation supplémentée avec des graines d'*A. thaliana* renfermant jusqu'à 3 % en poids de Nb reconnaissant l'adhésine des souches entérotoxiques (Virdi *et al*, 2013). Dans le même esprit, la technologie *MucoRice* visant à produire dans le riz des Nb solubles administrables directement après dispersion dans l'eau a été validée pour une immunisation passive orale contre les rotavirus chez des souris (Abe *et al*, 2014; Tokuhara *et al*, 2013). Les insectes sont également considérés comme une plateforme de production prometteuse pour approvisionner les pays en développement, à bas prix et à grande échelle, en Nb destinés à lutter contre les rotavirus (Gómez-Sebastián *et al*, 2012). L'originalité de l'approche repose sur l'utilisation du papillon *Trichoplusia ni* en tant que bioréacteur vivant pour récupérer environ 20 mg de Nb neutralisants par gramme de larves lyophilisées (Vega *et al*, 2013). Un traitement prophylactique contre le sérotype G3 de rotavirus par ingestion de "lactobodies" avait déjà été proposé auparavant à partir du probiotique *Lactobacillus paracasei* modifié pour exprimer à sa surface des Nb dirigés contre la capsid du virus (Pant *et al*, 2006).

De façon plus classique, les Nb sont purifiés après leur expression, chacune des phases de purification pouvant être intégrée aux systèmes de chromatographie liquide automatisés (*fast protein liquid chromatography*, FPLC) en suivant les protocoles standards établis pour n'importe quelle autre protéine recombinante.

1.2 Obtention de 23 Nanobodies anti-GFLV

L'objectif principal de ma thèse étant de produire des Nb dirigés contre la capsid du GFLV dans le but de mieux caractériser les déterminants de sa transmission, j'ai tout d'abord passé deux mois à la *Vrije Universiteit Brussel* (VUB) à Bruxelles dans le groupe de Serge MUYLDERMANS, co-inventeur des Nb, pour les obtenir. L'ensemble des étapes initiales d'obtention des Nb (immunisation, construction et criblage de la banque) a été réalisé d'après le protocole standard (Ghassabeh *et al*, 2010; Vincke & Muyldermans, 2012) (cf Chapitre 4.2.1.2 : Materials and methods) défini par le *Nanobody Service Facility* (NSF) du *Vlaams Institute voor Biotechnologie* (VIB). Une fois la collection de Nb obtenue, j'ai procédé à leur caractérisation individuelle et poursuivi l'étude de leurs applications potentielles à l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) à Colmar et à l'Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP) à Strasbourg.

1.2.1 Construction d'une banque de V_HH spécifiques

Deux mois avant le démarrage de la thèse, un dromadaire (heureux résident des Îles Canaries resté anonyme) a été immunisé à six reprises à intervalle hebdomadaire, par injection sous-cutanée de 100 µg de particules virales de GFLV-F13 purifiées. Par souci d'économie et pour un gain de temps, un même animal est souvent immunisé simultanément avec plusieurs antigènes différents, mais en raison de la forte immunogénicité supposée des virus, il a été jugé préférable dans ce cas précis de restreindre l'immunisation au seul GFLV. Au terme de la période d'immunisation, l'efficacité de la réponse immunitaire a été évaluée à Bruxelles par un ELISA qui a confirmé la présence dans le sérum dilué jusqu'à 7000 fois d'IgG dirigées contre le GFLV, sans toutefois donner à ce stade de l'analyse des indications sur leur nature conventionnelle ou à chaînes lourdes.

Les séquences codant pour les V_HH ont été amplifiées par deux PCR successives à partir des cDNA correspondant aux mRNA contenus dans les lymphocytes B isolés de 50 ml de sang puis insérées dans le phagemide pHEN4 (Ghahroudi *et al*, 1997) [Figure 3.4]. Placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription pLac, elles sont encadrées en amont par une séquence signal *pelB* dirigeant le Nb

capturés par un anticorps polyclonal anti-GFLV (pour core 28R). Le facteur d'enrichissement a été suivi en comparant, après chaque cycle, les titres des phages retenus en présence ou en absence de GFLV, estimés d'après le nombre d'unités formant colonies après infection (Zhu *et al*, 2014). À partir du deuxième cycle, un enrichissement substantiel en Nb spécifiques du GFLV, d'environ 2000 fois pour core 28 et d'environ 100 fois pour core 28R, a été obtenu. Afin de s'assurer de conserver au maximum toute la variété des séquences susceptibles de coder pour des Nb spécifiques du GFLV et ainsi limiter les risques de perdre un candidat intéressant, il a été décidé de procéder au criblage des banques dès le deuxième cycle de *biopanning*.

1.2.2 Criblage des banques

Habituellement, le criblage n'est réalisé qu'avec l'antigène ayant servi à l'immunisation et au *biopanning*, mais l'objectif initial du projet visant à isoler des Nb dirigés contre le site présumé d'interaction avec *X. index*, les deux mutants du GFLV défailants pour la transmission, caractérisés précédemment (Schellenberger *et al*, 2010; 2011), ont également été utilisés dès cette étape. Les extraits périplasmiques provenant des cultures (1 ml) de 285 colonies individuelles prélevées aléatoirement, dont 189 colonies issues de core 28 et 96 colonies issues de core 28R ont été testés par ELISA (*Periplasmic Extract Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, PE-ELISA) pour leur capacité à reconnaître 1 µg de GFLV-F13, de GFLV-TD (Schellenberger *et al*, 2011) et de GFLV-G2 (Schellenberger *et al*, 2010) passivement immobilisés.

Tous les clones conduisant à un rapport de l'absorbance à 405 nm mesurée en présence de GFLV-F13 sur l'absorbance mesurée en absence de virus (rapport signal/bruit) supérieur à 2 (ou éventuellement proche de 2) ont été sélectionnés et séquencés dans le but d'identifier des Nb uniques au niveau des séquences protéiques de leurs CDR. Au total, 104 clones reconnaissant spécifiquement le GFLV-F13, dont 56 provenant de core 28 et 48 provenant de core 28R, ont été retenus, mais ils ne correspondent respectivement qu'à 17 et 15 clones différents après séquençage. À partir des deux banques combinées, 23 clones [Tableau 3.1] qui présentent entre eux une divergence d'au moins un acide aminé dans un de leurs CDR ont finalement été identifiés. Ils sont répartis en 11 familles dérivant de lignées lymphoïdes B différentes établies d'après la similitude des séquences protéiques de leur CDR3 (longueur identique et plus de 80 % d'identité), ce qui traduit potentiellement une large diversité d'épitopes reconnus. Du fait de la contribution généralement majoritaire de la région CDR3 à la liaison avec l'antigène (De Genst *et al*, 2006), il est en effet communément admis que, dans une même famille, les Nb reconnaissent le même épitope mais avec des caractéristiques d'affinité, de solubilité ou de stabilité qui peuvent différer. Par contre, la spécificité de reconnaissance varie habituellement entre membres de familles différentes.

L'analyse des résultats des PE-ELISA met en évidence des différences d'affinité et de reconnaissance selon les Nb et selon les souches virales testées. De façon remarquable, le Nb122 apparaît par exemple fortement discriminant entre le GFLV-TD et les autres souches. Les valeurs absolues des rapports d'absorbance déterminés à partir des PE-ELISA doivent toutefois être considérées avec précaution car elles se rapportent à un extrait cellulaire brut où la concentration en Nb n'est pas standardisée et peut considérablement varier d'une culture à une autre. Le rapport signal sur bruit de fond peut donc être autant le reflet de l'affinité d'un Nb envers son antigène que de sa qualité d'expression dans une culture bactérienne réalisée à petite échelle. Il est ainsi possible, pour un même extrait périplasmique, d'estimer l'affinité relative d'un Nb envers différents antigènes, mais on ne peut pas comparer directement entre eux les résultats obtenus pour différents Nb. On observe malgré tout que des tendances semblent parfois

se dessiner pour des Nb appartenant à une même famille comme dans le cas de la famille 2 qui ne montre pas de reconnaissance du GFLV-G2.

Il est également peu légitime de comparer les banques entre elles puisqu'elles ne contiennent pas le même nombre initial de clones, qu'elles n'ont pas été enrichies selon la même méthode et qu'elles n'ont pas été testées sur un effectif de taille identique. Néanmoins, l'occurrence des différentes séquences de Nb obtenues à l'issue du criblage ne révèle pas de différence majeure quant à la diversité de chacune des banques. Quelle que soit la banque considérée, deux familles sont plus abondamment représentées et contiennent, à parts quasi égales, près de 40 % de l'ensemble des Nb finalement sélectionnés [Tableau 3.1], ce qui reflète probablement la reconnaissance d'épitopes plus fortement immunogènes et accessibles.

Famille	Taille (aa)			Nanobody	MM (kDa)	Occurrence		Liaisons S-S	PE-ELISA			Rendement (mg/l)	
	Nb	CDR1	CDR2			CDR3	core28		core28R	GFLV-F13	GFLV-TD		GFLV-G2
1	137	10	17	22	23	14,8	2	0	1	3,28	1,90	3,77	2,8
					101	14,8	5	7	1	4,56	2,03	2,62	-
					126	14,9	1	6	1	10,14	11,71	4,42	4,7
					p71	15,0	0	1	1	2,82	2,86	1,80	-
					p75	14,9	0	1	1	8,66	9,94	6,86	-
2	132	10	17	17	37	14,4	1	0	2	7,53	7,87	0,93	0,3
					77	14,2	1	0	2	2,36	1,51	1,09	-
					171	14,2	22	5	2	43,46	7,14	1,13	5,2
					p59	14,2	0	1	2	11,95	11,78	1,10	1,6
3	133	10	17	18	125	14,8	1	1	2	49,87	6,41	34,44	-
					159	14,7	1	0	2	11,88	2,47	6,76	-
					p25	14,7	0	1	2	6,27	6,19	6,68	-
4	135	10	17	20	15	14,9	1	0	2	4,91	2,69	1,13	1,1
					p77	15,0	0	1	2	1,87	2,19	2,04	1,6
5	141	10	17	26	34	15,1	1	0	3	7,23	6,80	1,13	0,2
					80	15,2	1	0	3	2,48	1,72	1,07	-
6	131	10	17	16	155	14,5	1	2	2	6,81	2,85	2,85	1,2
					172	14,4	1	1	2	5,60	2,34	1,45	2,4
7	128	10	18	12	38	14,0	2	2	1	4,14	4,92	3,18	0,8
8	135	10	21	16	122	15,0	2	0	1	21,74	0,99	23,74	5,4
9	126	10	16	19	137	13,6	2	4	2	4,65	1,91	1,07	2,6
10	134	10	17	12	139	14,7	1	1	2	33,11	6,10	6,83	-
11	134	10	17	19	p12	14,7	0	1	2	2,29	1,68	1,05	1,8

Tableau 3.1 | Principales caractéristiques des 23 Nb anti-GFLV sélectionnés.

Une collection de 23 Nb uniques, reconnaissant tous le GFLV-F13, a été obtenue à l'issue du criblage des banques core 28 et core 28R. Les Nb sont répartis, d'après la séquence protéique de leur CDR3, en 11 familles différentes représentées par une couleur et par un nombre (colonne Famille), ce qui constitue potentiellement une large diversité d'épitopes reconnus et d'affinités. Pour chaque Nb (colonne Nanobody), le tableau indique, en nombre d'acides aminés, sa taille totale comprenant le 6His-tag (colonne Nb) et celle de chacun de ses CDR (colonnes CDR1, CDR2 et CDR3) définis selon la numérotation de Kabat (Kabat *et al*, 1991), sa masse moléculaire en kDa (colonne MM), le nombre de fois où sa séquence a été identifiée dans chacune des banques (colonne Occurrence), le nombre de ponts disulfures prédits (liaisons S-S) et sa réactivité vis-à-vis des 3 souches virales GFLV-F13, -TD et -G2 (colonne PE-ELISA). Cette dernière a été déterminée par ELISA réalisé à partir des extraits périsplasmiques et est représentée par le rapport signal sur bruit obtenu sous forme de *heat map* allant du vert (rapport ≥ 20) au blanc (rapport = 2) et bleu (rapport ≤ 1). Le Nb122 semble se démarquer du reste de la collection par son absence de reconnaissance du GFLV-TD. Le rendement moyen de purification, exprimé en mg de Nb obtenu par litre de culture bactérienne, est également indiqué le cas échéant (colonne Rendement). Note : le nom des Nb isolés à partir de core 28R est précédé de la lettre p en raison du recours à un anticorps polyclonal lors du *biopanning*.

De manière plus détaillée, le Nb171 ressort clairement surreprésenté, puisque sa séquence correspond respectivement à 48 % et à 14 % des séquences isolées à partir de core 28 et de core 28R. À

la vue de son rendement moyen de purification (5,2 mg par litre de milieu de culture) qui est supérieur au rendement moyen obtenu pour l'ensemble des Nb produits dans cette étude (2,3 mg/l), on peut supposer que cette surreprésentation tient en partie à son excellente capacité à être produit en bactéries. La technique du *phage display* tend en effet à "contre-sélectionner" les Nb dont l'efficacité de production est faible en raison de limitations au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel, aboutissant à une perte de diversité en Nb spécifiques à chaque cycle d'enrichissement (Miyazaki *et al*, 2015). En revanche, elle a l'avantage de favoriser la récupération des Nb qui sont les plus adaptés à un futur procédé d'expression en bactéries. Une étude récente (Monegal *et al*, 2012) a toutefois démontré que l'utilisation du peptide signal PelB, qui fait intervenir la voie de sécrétion post-traductionnelle SecB-dépendante, est également susceptible d'induire un appauvrissement des Nb dont la conformation est la plus thermodynamiquement favorable, en les piégeant repliés dans le cytoplasme avant leur export (Steiner *et al*, 2006), qui nécessite leur maintien dans une conformation lâche, vers le périplasma où se déroule l'assemblage des phages. Les facteurs influençant la sélection d'un Nb au cours des cycles de *biopanning* par *phage display* sont donc multiples et ne se limitent pas à la seule affinité d'un Nb pour l'antigène d'intérêt, mais font également intervenir son efficacité de synthèse et de repliement, son éventuelle toxicité pour la cellule ou encore l'optimum d'exposition de ses CDR après fusion à pIII voire la stœchiométrie de sa reconnaissance de la particule virale.

Les séquences des Nb anti-GFLV sélectionnés (non détaillées pour raison de confidentialité), montrent qu'ils possèdent dans leur FR2 la plupart des acides aminés hydrophiles conservés caractéristiques des domaines $V_{H/H}$ (Muyldermans *et al*, 1994) (cf Chapitre 2.2.1 : Structure d'un Nanobody). Ces Nb dérivent donc tous, *a priori*, de segments génétiques germinaux $V_{H/H}$ bien qu'il soit courant d'identifier dans les banques de Nb 5 à 10 % de domaines de types V_H (Monegal *et al*, 2012). En outre, les Nb issus de huit familles (familles 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 et 11) contiennent, en plus du pont disulfure intra-domaine reliant le FR1 au FR3 retrouvé canoniquement dans tous les domaines variables des IgG, un pont disulfure additionnel. Il stabilise la conformation de la longue boucle du CDR3 des $V_{H/H}$ mais pourrait restreindre leur aptitude à fonctionner efficacement dans le cytoplasme. La famille 5 présente de plus un pont disulfure intra-boucle dans le CDR3. Par ailleurs cinq Nb (Nb101, Nbp71, Nbp75, Nb159 et Nbp12) contenaient un codon stop ambre en tout début du FR4 qui a imposé la réalisation d'une mutagenèse dirigée avant de pouvoir les produire dans une souche d'expression, classiquement non suppressive contrairement à la souche TG1 utilisée lors du *biopanning*.

Comme déjà souligné, ces premiers résultats émanent d'un criblage réalisé à partir d'extraits périplasmiques où la concentration de Nb utilisée n'est pas normalisée mais directement dépendante de l'inoculum de départ et de l'efficacité de production de chaque Nb en bactérie. La production et la purification des Nb a donc été l'étape suivante nécessaire pour permettre une caractérisation plus fiable des performances de chaque Nb anti-GFLV du panel obtenu.

1.3 Caractérisation préliminaire des Nanobodies obtenus

1.3.1 Production et purification des Nb

Les séquences codant pour les 23 Nb sélectionnés ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression pHEN6 (Conrath *et al*, 2001), équivalent au vecteur pHEN4 exceptés le HA-tag et gIII qui sont remplacés par une séquence hexa-histidine (6His-tag) facilitant la purification. Les Nb ont été produits par sécrétion périplasmique dans la souche *E. coli* WK6 puis extraits par choc osmotique et purifiés par chromatographie d'affinité métallique (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*, IMAC) couplée à

une gel-filtration (*Size Exclusion Chromatography*, SEC). Les rendements de production moyens, déterminés à partir d'une à deux séries indépendantes de cultures en milieu non renouvelé de 2 x 500 ml, varient notablement selon les Nb considérés et s'échelonnent entre une expression infime de l'ordre de 0,2 mg/l (Nb34) à un maximum de 5,4 mg/l (Nb122) [Tableau 3.1]. De façon comparable, des rendements de plusieurs mg de Nb exprimés dans le périplasma sont couramment obtenus au NSF. Pour neuf Nb, le rendement n'a pas été évalué au cours de ce projet à cause d'une expression difficile (famille 3 et Nb80), d'incidents techniques survenus au cours de la purification (Nb139) ou d'un retard dans la disponibilité des clones d'expression (Nb101, Nbp71, Nbp75, Nb159 et Nb77). La difficulté d'expression de la famille 3 intrigue au regard des forts ratios signal/bruit obtenus par PE-ELISA. Il est possible qu'elle découle d'une toxicité cellulaire induite par les Nb de cette famille puisque, par la suite, elle a pu être partiellement surmontée en retardant l'induction de l'expression. En fin de phase exponentielle de croissance, le changement métabolique et le ralentissement de croissance subis par les bactéries sont en effet susceptibles d'atténuer leur réponse face à des protéines étrangères toxiques et de réduire l'agrégation de ces dernières par la diminution de la synthèse protéique.

Le procédé de sécrétion dans le périplasma, en plus de favoriser un repliement correct par l'export dans un environnement oxydant, évite la contamination par des protéines cytoplasmiques bactériennes (dix fois plus abondantes que les protéines périplasmiques (Quan *et al*, 2013)) lors de l'extraction et permet d'obtenir des Nb purifiés jusqu'à apparente homogénéité, souvent dès la sortie d'IMAC [Figure 3.5]. Le Nb137 se distingue des autres Nb produits car son analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (*Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) après purification révèle une double bande qui traduit une probable sensibilité séquence-dépendante aux protéases. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse du même extrait périplasmique fraîchement obtenu ou après stockage à -80 °C (souvent effectué avant purification en raison d'impératifs techniques liés notamment à la disponibilité des appareils de chromatographie) puisqu'avant congélation, seule la bande supérieure du doublet est visible [Figure 3.5].

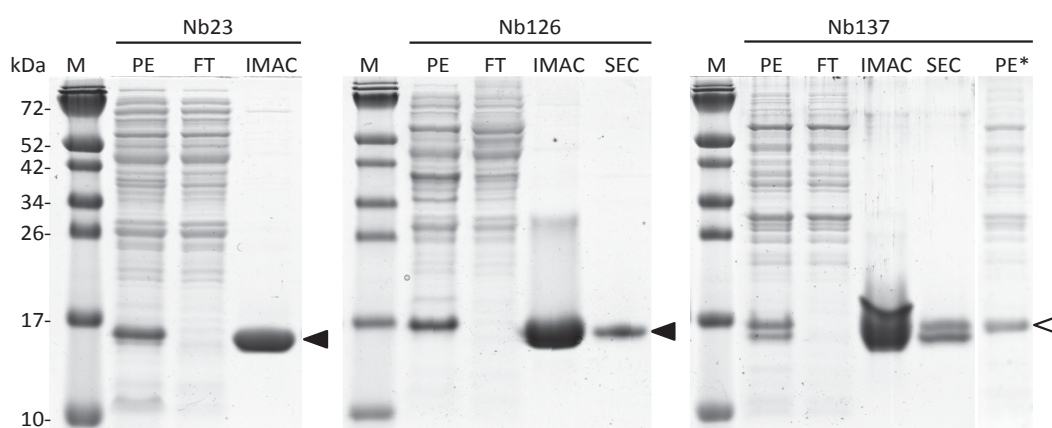


Figure 3.5 | Exemples représentatifs de la qualité de purification des Nb.

Analyse par SDS-PAGE (Tris-tricine acrylamide:bis-acrylamide (37.5:1) 16 %) et coloration au bleu de Coomassie des extraits périplasmiques (PE), des fractions non retenues (FT), des fractions éluées après chromatographie d'affinité (IMAC) et des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de taille (SEC) des Nb23 (gauche), Nb126 (centre) et Nb137 (droite). L'analyse des Nb23 et Nb126 ne révèle qu'une seule bande (flèche noire) migrant aux environs de 15 kDa reflétant une purification obtenue à apparente homogénéité. La purification du Nb137 aboutit à l'obtention de deux bandes rapprochées traduisant une possible sensibilité séquence dépendante aux protéases comme suggéré par l'analyse d'un précédent dépôt du même PE mais fraîchement extrait (PE*) qui migre en une bande unique (flèche blanche) correspondant à la bande supérieure du doublet récupéré en sortie de purification.

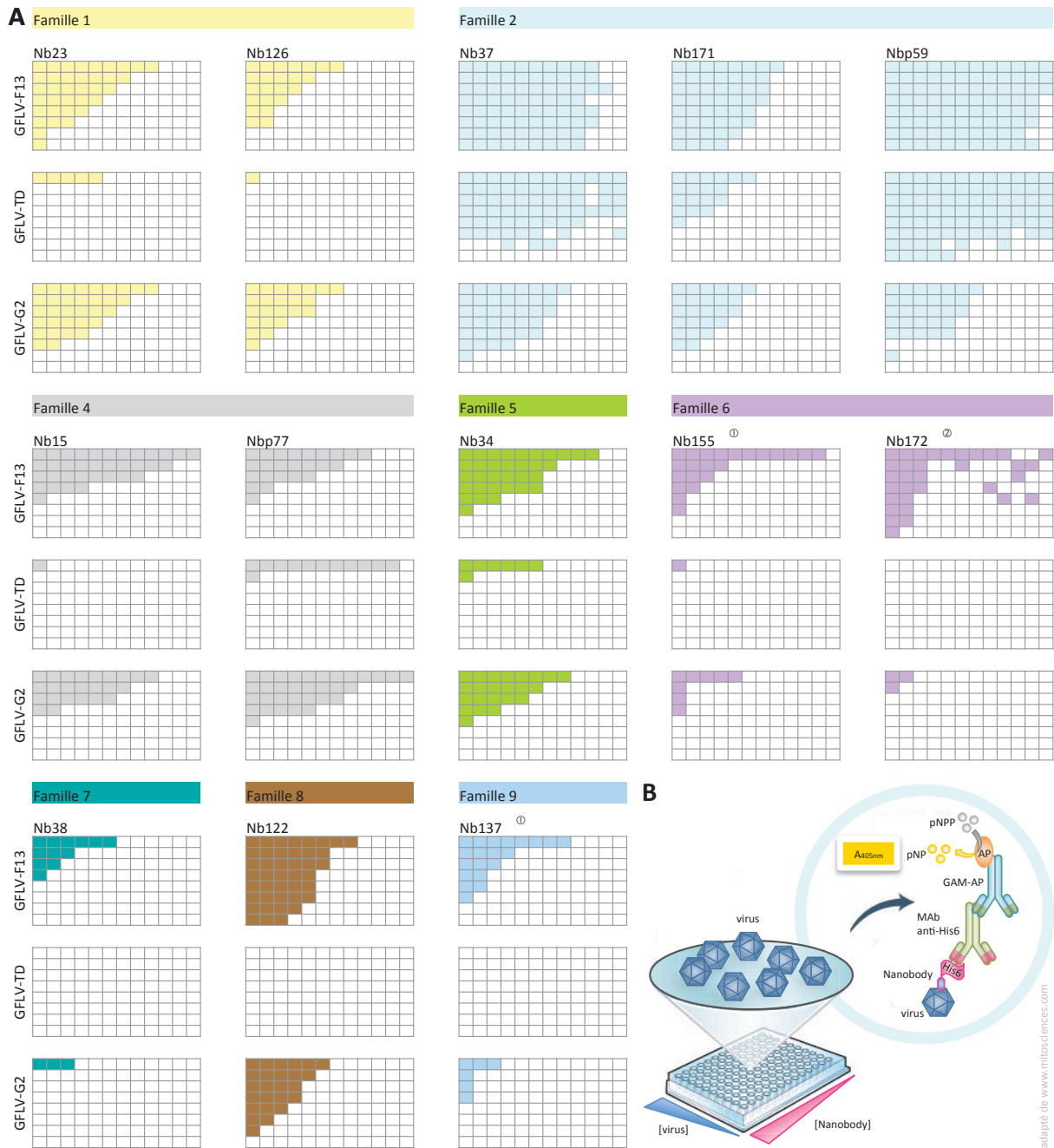


Figure 3.6 | Évaluation de la réactivité des Nb purifiés envers le GFLV-F13, -TD et -G2.

A. La réactivité envers le GFLV-F13, -TD et -G2 de treize Nb purifiés a été évaluée par ELISA. Chaque combinaison de virus et de Nb est schématisée par une plaque ELISA où tous les puits dont l'absorbance à 405 nm ($A_{405\text{ nm}}$) est deux fois supérieure à l' $A_{405\text{ nm}}$ obtenue en l'absence de virus sont représentés par des cases colorées. Des comportements similaires en termes de spectre de reconnaissance peuvent être observés entre les Nb appartenant à une même famille. **B.** Représentation schématique du protocole ELISA utilisé. Le virus a été adsorbé passivement sur la plaque ELISA, dilué en cascade de facteur 2 en colonne à partir d'une concentration de $5\ \mu\text{g/ml}$ dans du PBS 1x. Après blocage des sites aspécifiques avec 1 % de lait, le Nb a été distribué en ligne selon une dilution en cascade de facteur 2 avec une concentration initiale de $1.10^{-7}\ \text{M}$, $2.10^{-6}\ \text{M}$ (①) ou $1.10^{-5}\ \text{M}$ (②). Le Nb est détecté par un anticorps monoclonal reconnaissant son 6His-tag (MAb anti-His6) dont la présence est par la suite révélée par un anticorps dirigé contre les anticorps monoclonaux et couplé à la phosphatase alcaline (GAM-AP). L'absorbance est lue à 405 nm 60 à 80 min après ajout du substrat (pNPP).

1.3.2 Évaluation de la réactivité des Nb envers les mutants déficients pour la transmission

L'évaluation par ELISA de la réactivité des Nb purifiés vis-à-vis du GFLV-F13, -TD et -G2 confirme qu'il existe des différences notables d'affinité et d'épitopes reconnus entre les différents Nb [Figure 3.6].

À la différence des résultats des ELISA réalisés à partir des extraits périplasmiques, on note cette fois une reconnaissance particulièrement faible du GFLV-TD par l'ensemble des Nb testés. Elle pourrait être imputable à une contamination des purifications virales. En effet, alertés par la détection en serre de *Sowbane mosaic virus* (SoMV) peu après la préparation des purifications, on a mis en évidence par SDS-PAGE et par PCR la présence de ce sobémovirus à des degrés divers dans toutes les purifications virales utilisées dans ces ELISA [Figure 3.7]. La purification de GFLV-TD semble être la plus affectée par la contamination, la CP du SoMV y étant détectée en proportion égale à celle du GFLV, faussant ainsi complètement la quantité de GFLV réellement employée dans l'ELISA.

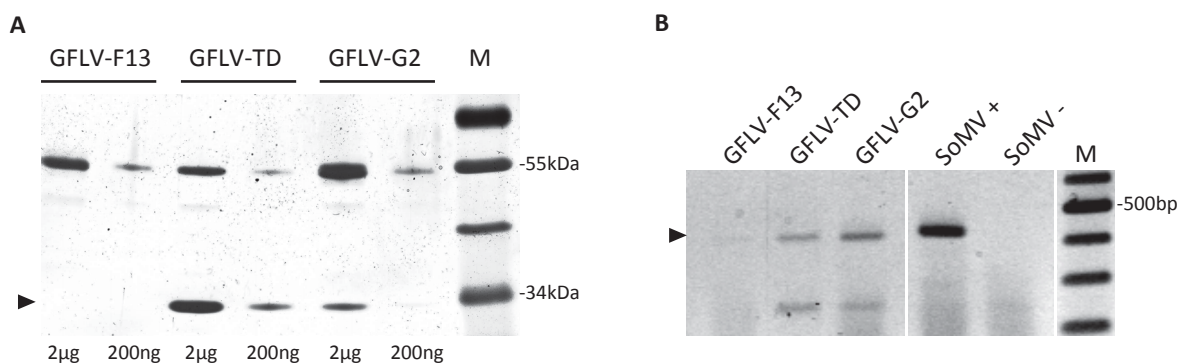


Figure 3.7 | Évaluation de la pureté des purifications virales utilisées pour la caractérisation des Nb.

A. 2 μg et 200 ng de préparations virales purifiées correspondant aux souches GFLV-F13, GFLV-TD et GFLV-G2 utilisées pour l'évaluation du spectre de reconnaissance des Nb ont été séparés par SDS-PAGE (Tris-glycine acrylamide:bis-acrylamide (37.5:1) 10 %) et colorés au bleu colloïdal. En plus de la bande attendue à 55 kDa correspondant à la protéine de capside du GFLV, une bande additionnelle migrant à 34 kDa (flèche) a été mise en évidence dans le GFLV-TD et dans une moindre mesure dans le GFLV-G2 traduisant une contamination par le *Sowbane mosaic virus* (SoMV). **B.** La nature de la contamination a été confirmée par RT-PCR dans les 3 purifications virales (flèche). Un extrait de *Chenopodium quinoa* infecté par le SoMV (SoMV+) a été utilisé comme contrôle positif et un extrait de *C. quinoa* non infecté (SoMV-) comme contrôle négatif.

Le Nb122 est malgré tout à nouveau remarquable par son absence totale de reconnaissance *in vitro* du GFLV-TD, aux concentrations utilisées, alors qu'il reconnaît avec une affinité appréciable les deux autres souches. Ceci est d'autant plus remarquable que ce variant ne diffère de la souche F13 que par le seul résidu Asp₂₉₇ en lieu et place d'un résidu Gly. Le Nb122 possède donc probablement un épitope chevauchant ce résidu dans une région située à proximité du site potentiel d'interaction avec *X. index* (Schellenberger *et al*, 2011). Un tel degré de spécificité a déjà été décrit pour un Nb anti-GFP (*Green Fluorescent Protein*) qui reconnaît également la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) mais pas la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) (Rothbauer *et al*, 2008) qui, dans la zone de contact avec le Nb, ne diverge pourtant des deux autres protéines fluorescentes que par la position d'un seul acide aminé (Kubala *et al*, 2010). Le Nbp59 se distingue lui aussi des autres Nb car il présente une très grande affinité pour les trois souches de GFLV testées.

Cette caractérisation préliminaire par ELISA valide la fonctionnalité des Nb *in vitro* et confirme leur fort potentiel en tant qu'outil pour le phyto-diagnostic. Ils offrent l'opportunité de disposer d'anticorps reproductibles à façon et à moindre coût, sans altération de leurs caractéristiques, en s'affranchissant des inconvénients liés aux disparités des lots d'immunisation, inhérentes à la production d'anticorps

polyclonaux ou à la perpétuation onéreuse des lignées d'hybridomes, nécessaires à la fabrication d'anticorps monoclonaux. Ce champ d'application a été poursuivi indépendamment par Léa ACKERER dans le cadre d'une thèse réalisée sous une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE), financée par l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), l'organisme technique industriel national dédié à la recherche appliquée pour l'ensemble de la filière viti-vinicole française. La méthode de détection, qui mettait en œuvre un échafaudage complexe d'anticorps dans ces premiers essais, a été simplifiée depuis par le greffage d'une séquence *Strep-Tag II* (Skerra & Schmidt, 2000) grâce à laquelle les Nb peuvent être directement révélés par de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline. Cela a permis d'évaluer plus efficacement le spectre de reconnaissance des Nb, et notamment celui du Nb23, vis-à-vis d'un plus grand assortiment d'isolats de GFLV (cf Chapitre 4.2.1.2 : Figure S2).

Dans l'optique de sonder au plus vite toutes les possibilités d'exploitation des Nb, au-delà de leur capacité à détecter le GFLV à des fins de diagnostic, je me suis basée sur cette caractérisation préliminaire, sans attendre d'avoir plus de précisions, pour choisir sur des critères un peu arbitraires un nombre réduit de Nb et poursuivre l'exploration de leur potentiel. Le choix s'est porté sur quatre Nb bien produits en bactéries et issus de quatre familles différentes : le Nb23 qui appartient à la famille majoritaire et possède une affinité moyenne pour le GFLV-F13, le Nb122 qui est discriminant envers un mutant mal transmis par *X. index*, le Nbp59 qui au terme de la caractérisation préliminaire affiche la plus grande affinité pour le GFLV et le Nb15.

2 Développement de Chromobodies

Afin d'élargir leur champ d'application, l'extrémité C-terminale des Nb23, Nb122, Nbp59 et Nb15 a été fusionnée à des protéines fluorescentes (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP (Cormack *et al*, 1996) ou *Tag Red Fluorescent Protein*, TRFP (Merzlyak *et al*, 2007)) avec insertion d'une séquence *linker* (Gly)₃-Ser-(Gly)₃ pour former des Chromobodies (Cb). Le choix du sens de la fusion a été conditionné par le sens déjà utilisé dans le *phage display* afin de minimiser l'impact sur l'activité des Nb, l'extrémité N-terminale se situant à proximité immédiate du site de liaison à l'antigène. L'objectif étant de pouvoir exploiter les Cb dans des techniques d'immuno-marquage ou en tant que biocapteur (*biosensor*) pour l'étude de la transmission et du mouvement du GFLV, il fallait disposer de ces molécules sous forme de protéines purifiées d'une part, et sous forme de protéines fonctionnelles en plante d'autre part. Pour leur production et leur purification, forts de l'expérience acquise avec les Nb, on s'est dans un premier temps tout naturellement orientés vers une expression dans *E. coli*. Pour leur expression en plante, on s'est dirigés vers l'espèce modèle *N. benthamiana* qui a l'avantage de présenter des cycles de culture courts et d'être bien adaptée à l'expression transitoire de protéines, à l'observation en microscopie et à la propagation du GFLV.

2.1 Production de Chromobodies purifiés

2.1.1 Expression en bactéries

Produire efficacement des Nb fusionnés à des protéines fluorescentes dans *E. coli* est en soi un véritable défi en raison des conditions d'oxydo-réduction favorables au repliement correct de chacune des composantes de la protéine de fusion qui sont diamétralement opposées. Les Nb sont communément adressés au périplasme car ils contiennent des liaisons disulfures dont la formation nécessite *a priori* un

environnement oxydant. En revanche, les protéines fluorescentes sont des protéines cytoplasmiques qui peinent à adopter une conformation fonctionnelle dans le périplasma (Feilmeier *et al*, 2000; Dammeyer & Tinnefeld, 2012). Cette antinomie a parfois été contournée par l'utilisation d'un dérivé de la GFP (*superfolder* GFP, sfGFP (Pédelacq *et al*, 2005)) qui présente des mutations garantissant un repliement plus rapide et robuste, compatible avec la voie de sécrétion générale (Aronson *et al*, 2011; Dammeyer & Tinnefeld, 2012) ou à l'inverse (Olichon & Surrey, 2007) par l'utilisation de Nb sélectionnés pour leur capacité à fonctionner dans le cytosol et exprimés en fusion avec la protéine chaperonne DsbC (*Disulfide bond isomerase C*) qui est normalement impliquée dans la maturation des ponts disulfures dans le périplasma.

Le premier essai de production des Cb, réalisé naïvement en suivant à l'identique le protocole de sécrétion utilisé jusque-là pour la production des Nb non fusionnés a ainsi été, *a posteriori* sans surprise, infructueux même en variant les souches d'*E. coli* utilisées. C'est pourquoi un changement de stratégie a été opéré avec l'élimination de la séquence d'adressage au périplasma par sous-clonage des séquences des Cb sous le contrôle d'un promoteur de transcription T7 dans le vecteur p0GWA (Busso *et al*, 2005) pour tenter de les exprimer dans le cytoplasme de différentes souches d'expression bactériennes disponibles au laboratoire. Aucune des souches d'*E. coli* transformées (BL21(DE3), une souche classique d'expression, SoluBL21(DE3), une souche tolérante pour les protéines toxiques ou insolubles et Origami2, une souche dont l'activité réductrice du cytoplasme est altérée) n'a révélé d'aptitude à exprimer un Cb fonctionnel, les rares clones parvenant à se maintenir après induction perdant leur capacité d'émettre de la fluorescence.

Finalement, après avoir laissé en suspens la production de Cb en bactéries, la purification partielle des Cb avec des rendements comparables à ceux des Nb a été obtenue dans le cadre du projet de développement de l'outil Nb pour la détection du court-noué par ELISA, grâce à l'expression cytoplasmique dans la souche SHuffle (Zarschler *et al*, 2013). Tout comme la souche Origami2, elle contient une double mutation dans les gènes codant pour la thioredoxine réductase (*trxB*) et pour la glutathione réductase (*gor*) censée améliorer la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme, mais elle exprime de surcroît DsbC dans le cytoplasme.

2.1.2 Expression transitoire en plante

En parallèle des essais de production en bactéries, les séquences codant pour les Cb ont été sous-clonées dans le plasmide binaire pEAQHTDest3 (Sainsbury *et al*, 2009) [Figure 3.8] pour apprécier leur aptitude à être exprimés en plantes. Ce vecteur est conçu pour atteindre de hauts niveaux d'expression de protéines hétérologues en plantes grâce à la présence des régions non traduites 5'-UTR (*untranslated region*) et 3'-UTR du RNA2 du *Cowpea mosaic virus* (CPMV) qui augmentent les niveaux de traduction de la séquence d'intérêt qu'elles encadrent. Le fragment d'ADN transférable à la plante (*transfer DNA*, T-DNA) contient de plus le gène codant pour la protéine suppresseur de *silencing* P19 du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) afin d'augmenter encore davantage le niveau et la durée d'expression de la protéine d'intérêt sans recourir à l'utilisation de plusieurs plasmides.

Après infiltration d'agro-bactéries contenant ces constructions dans des feuilles de *N. benthamiana*, les Cb sont exprimés dans la majorité des cellules avec des niveaux d'expression satisfaisants et adoptent une distribution nucléo-cytoplasmique diffuse qui n'est pas perturbée par la coexpression avec une autre protéine [Figure 3.9 | A, C]. En revanche, lors de la coexpression avec la CP du GFLV, la localisation subcellulaire des Cb est radicalement modifiée [Figure 3.9 | B, D]. Ils apparaissent concentrés sous forme d'agrégats répartis dans le cytoplasme et de structures ponctuelles dans le noyau. Cette relocalisation

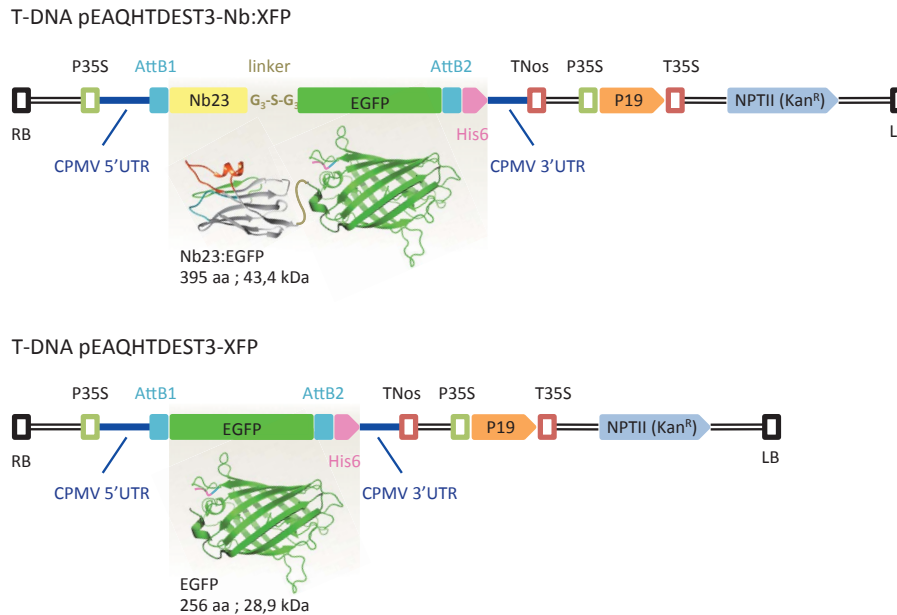


Figure 3.8 | Schéma représentatif des constructions utilisées pour l'expression de Cb en plante.

Les vecteurs pEAQHTDest3 permettent d'atteindre de hauts niveaux d'accumulation de protéines recombinantes en plante grâce à la combinaison du contrôle de l'expression du transgène par le promoteur de transcription fort p35S du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), de l'augmentation de l'efficacité de la traduction par les séquences 5' et 3' UTR modifiées du CPMV qui flanquent la séquence du transgène et de la coexpression du suppresseur de *silencing* P19 du TBSV. Ces vecteurs contiennent une cassette de clonage compatible avec la technologie Gateway et ajoutent un 6His-tag à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante pour faciliter sa purification. L'ADN situé entre les séquences consensus définissant les bordures droite et gauche est transféré dans les cellules végétales où il s'intègre par recombinaison illégitime dans le génome de la plante. Le sens du clonage et du transfert est tel que l'expression de la protéine fluorescente ne peut se faire que concomitamment à celle du Nb. Le nombre de résidus et la masse moléculaire de deux exemples représentatifs de produits d'expression (Nb23:EGFP et EGFP) sont indiqués en dessous de leurs modélisations 3D respectives. RB, LB : bordure droite (*right border*) et gauche (*left border*) du T-DNA ; P35S : promoteur de transcription de l'ARN 35S du CaMV ; CPMV 5'UTR, CPMV 3'UTR : extrémité 5' et 3' UTR du CPMV ; AttB1, AttB2 : séquences de recombinaison issues du système de clonage Gateway ; linker : séquence de liaison codant pour le peptide (Gly)₃-Ser-(Gly)₃ ; His6 : séquence de purification codant pour le peptide (His)₆ ; TNos : terminateur du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ; P19 : séquence codant pour le suppresseur de *silencing* du TBSV ; T35S : terminateur de l'ARN 35S du CaMV ; NPTII (Kan^R) : gène de résistance à la kanamycine.

caractéristique suggère une reconnaissance *in vivo* spécifique du GFLV par les Nb dont l'activité ne semble donc pas être affectée par la fusion à une protéine fluorescente.

Encouragée par le caractère soluble et apparemment actif des Cb en plante, j'ai cherché à contourner les difficultés de production rencontrées en bactéries en menant un essai de purification par IMAC d'un extrait brut de feuilles de *N. benthamiana* exprimant transitoirement le Nb23:EGFP. La tentative, bien que menée à bien avec un contrôle exprimant uniquement la EGFP n'a pas abouti avec le Cb, probablement en raison de niveaux d'accumulation insuffisants ce qui compromet généralement l'issue d'une purification par affinité métallique réalisée à partir d'extraits protéiques complexes. Des protéines endogènes riches en résidus His peuvent effectivement être souvent co-purifiées voire majoritairement purifiées par effet de compétition avec le 6His-tag de la protéine recombinante quand son expression est trop faible.

L'intérêt d'un système végétal pour la production de Nb intacts et fonctionnels a pourtant été décrit avec le Nb cAbLys3, dirigé contre le lysozyme, qui peut s'accumuler à des niveaux atteignant 30 % des

protéines totales solubles lorsqu'il est exprimé dans l'espace extracellulaire (apoplasme) de feuilles de *N. benthamiana* (Teh & Kavanagh, 2009). La sécrétion dans l'apoplasme présente en outre l'avantage de pouvoir utiliser des techniques particulièrement faciles à mettre en œuvre et potentiellement réalisables à grande échelle pour isoler une protéine recombinante. La méthode la plus communément employée consiste en un simple lavage de l'espace apoplastique foliaire par l'infiltration sous vide d'une solution aqueuse puis centrifugation à basse vitesse des feuilles entières détachées pour en récupérer les fluides intercellulaires (Goulet *et al*, 2011). Ce procédé ne draine quasiment que les protéines de l'apoplasme sans rompre les parois cellulaires ce qui conduit à l'obtention d'un extrait déjà partiellement enrichi et clarifié car débarrassé de la plupart des contaminants intracellulaires qui peuvent nuire à une purification réalisée à partir d'un broyat brut.

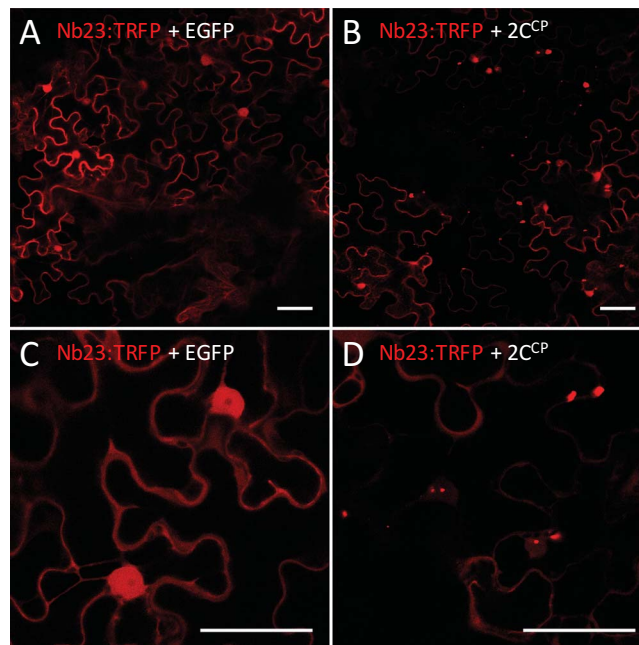


Figure 3.9 | Les Nb sont solubles et fonctionnels dans *N. benthamiana*.

Exprimé transitoirement en plante, seul ou avec la EGFP, le Nb23:TRFP est soluble d'où sa localisation nucléocytoplasmique diffuse (A, C). En coexpression avec la CP du GFLV-F13 (2C^{CP}), il est relocalisé de façon caractéristique en agrégats cytoplasmiques accompagnés de points dans le noyau (B, D). Des observations similaires ont été faites avec une fusion à la EGFP et avec les Nb122 et Nbp59. Les acquisitions ont été effectuées 42 h après infiltration d'*A. tumefaciens* resuspendues à $A_{595\text{ nm}} = 0,2$ pour le Nb23:TRFP et 0,4 pour la CP et la EGFP, à l'aide d'un microscope LSM510 [ZEISS] équipé d'objectifs Plan-Apochromat 20x/0.8 ou C-Apochromat 63x/1.2 avec une configuration *single-track* ($\lambda_{\text{excitation}} = 561\text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 575\text{-}615\text{ nm}$). Barres d'échelle : 50 μm . Note : l'expression de EGFP a été vérifiée par visualisation de fluorescence (A et C, non montré).

Un revirement de stratégie, contraire à celui opéré précédemment en bactéries, a donc été entrepris avec l'introduction de la séquence du peptide signal de la chitinase d'*A. thaliana* (Di Sansebastiano *et al*, 1998) dans les vecteurs pEAQHTDest3-Nb23:TRFP, -Nb122:TRFP et -Nbp59:TRFP en amont des séquences des Cb pour exporter ces derniers dans l'apoplasme. La couleur, étonnamment d'un rose magenta soutenu, de la fraction apoplastique qui a été récupérée par infiltration/centrifugation des feuilles agro-inoculées évoque une forte concentration en TRFP [Figure 3.10 | A]. La présence dans ces extraits de Cb entiers et fonctionnels a été confirmée par *dot blot* [Figure 3.10 | B] et par *western blot* [Figure 3.10 | C]. La spécificité des Cb ainsi produits corrobore les résultats obtenus jusque-là par ELISA avec les Nb, l'extrait apoplastique qui correspond au Nbp59:TRFP générant en *dot blot* un signal

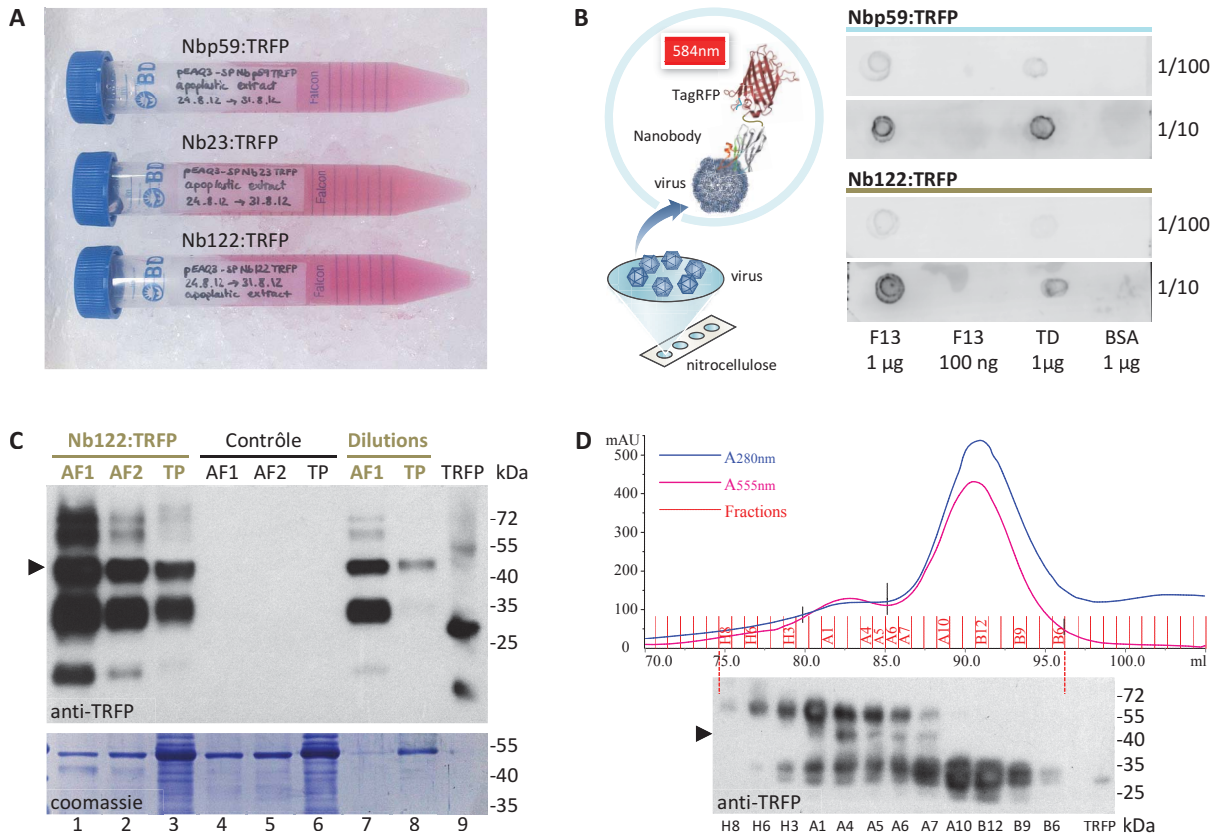


Figure 3.10 | Expression de Cb par sécrétion apoplastique dans *N. benthamiana*.

A. Extraits apoplastiques bruts issus de feuilles de *N. benthamiana* 7 jours après expression sécrétoire de Nbp59:TRFP, Nb23:TRFP ou Nb122:TRFP. Les feuilles exprimant les Cb ont été collectées, infiltrées avec de l'eau ultra-pure à 4°C puis centrifugées à 1000 g pour en extraire les fluides intercellulaires. On récupère ainsi environ 0,5 ml de couleur rose magenta par gramme de tissu frais. **B.** Évaluation par *dot blot* de la fonctionnalité des Nbp59:TRFP et Nb122:TRFP exprimés dans l'apoplasme. 1 µg ou 100 ng de GFLV-F13 et 1 µg de GFLV-TD ont été adsorbés sur une membrane de nitrocellulose qui a été incubée, après blocage avec 5 % de lait, avec deux dilutions (1/10^e et 1/100^e) des extraits apoplastiques préalablement concentrés environ 20 fois sur un filtre centricon (*cut-off* 10 kDa). 1 µg de *bovine serum albumin* (BSA) a été utilisé comme contrôle négatif. La réactivité des Cb sécrétés, évaluée par la détection de la fluorescence émise par la TRFP après excitation, semble spécifique et en adéquation avec les résultats précédemment obtenus par ELISA, le Nb122:TRFP ne reconnaissant que faiblement le GFLV-TD. **C.** Analyse par *western blot* d'un extrait apoplastique récolté 5 jours après expression sécrétoire de Nb122:TRFP (pistes 1, 2, 3, 7 et 8). 10 µl d'un 1^{er} lavage des fluides intercellulaires (*apoplastic fluids*, AF1) non dilué (pistes 1 et 4) ou dilué au 1/10^e (piste 7), d'un 2nd lavage (AF2) non dilué (pistes 2 et 5) et des protéines totales (*total proteins*, TP) diluées au 1/20^e (pistes 3 et 6) ou diluées au 1/200^e (piste 8) ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10 %, transférés sur membrane de PVDF et révélés à l'aide d'un anticorps anti-TRFP [Evrogen] après blocage avec 5 % de lait. Des feuilles non agro-infiltrées ont été utilisées comme contrôle négatif (pistes 4, 5 et 6) et un extrait total dilué au 1/50^e d'une plante exprimant la TRFP comme contrôle positif (piste 9). Le contenu protéique des extraits apoplastiques se révèle nettement moins complexe que celui des extraits totaux et le Cb intact apparaît à la taille attendue de 43 kDa (flèche), mais la présence de bandes surnuméraires suggère la présence de produits de dégradation ou de glycosylation. **D.** Purification par SEC d'un extrait apoplastique récolté 7 jours après expression sécrétoire de Nb122:TRFP. Le chromatogramme révèle 2 pics d'absorbance (*arbitrary unit*, mAU), mesurée à 280 nm (absorbance caractéristique des protéines, en bleu) et à 555 nm (absorbance dans le visible de la TRFP, en rose), mais l'analyse par *western blot* de 30 µl des fractions indiquées (en rouge) montre que le Cb intact (flèche) reste associé à un ensemble de protéines dont il ne représente qu'une faible proportion. Un extrait total dilué au 1/50^e d'une plante exprimant la TRFP a été utilisé comme contrôle positif.

équivalent avec le GFLV-F13 et le GFLV-TD, à la différence de l'extrait correspondant au Nb122:TRFP qui reconnaît bien le GFLV-F13, mais seulement partiellement le GFLV-TD. L'analyse par *western blot* après purification par IMAC et SEC d'un extrait apoplastique contenant le Nb122:TRFP [Figure 3.10 | D] indique cependant que la part de Cb intacts ne représente qu'une minorité des protéines purifiées. De plus il s'est avéré impossible, même après des étapes de purification supplémentaires (chromatographie échangeuse d'ions...), de séparer les Cb sécrétés de contaminants qui pourraient correspondre à des produits de glycosylation, de clivage *in vivo*, ou encore de dégradation post-purification, ces derniers pouvant résulter en partie d'un clivage de la TRFP induit par le chauffage des échantillons avant migration, comme décrit pour l'ensemble des protéines possédant un chromophore de type Ds-Red (Gross *et al*, 2000).

Malgré un protocole qui paraissait simple pour obtenir sans efforts des Cb actifs, les déboires rencontrés pour aboutir à leur purification efficace ont fait que l'optimisation de cette voie de production *in planta* a été abandonnée au profit d'une purification à partir d'une expression bactérienne cytoplasmique dans la souche SHuffle qui avait entre-temps été mise au point avec un succès relatif.

2.2 Expression stable de Chromobodies *in planta*

La relocalisation caractéristique des Cb lors d'une coexpression avec la CP du GFLV reflète leur fonctionnalité en plante et suggère la validité de l'outil Nb pour un suivi spatio-temporel d'une infection virale dans son hôte sans la nécessité de modifier le génome du virus. Ce champ d'application a été confirmé lors de l'expression transitoire de Cb dans des plantes infectées par le GFLV [Figure 3.11] où dans les zones où le virus est présent, la fluorescence des Cb est recentrée au niveau d'agrégats péri-nucléaires qui, par leur aspect et leur localisation, correspondent à la description des compartiments viraux formés par le GFLV au cours de sa multiplication (Ritzenthaler *et al*, 2002) [Figure 3.11 | E, F, J, K, L].

Lors des essais d'expression transitoire en plante, on a cependant parfois été confrontés à des événements d'agrégation limitée au cytoplasme des Cb en absence d'antigène ou d'expression différentielle selon les tissus [Figure 3.11 | K, L] pouvant compliquer l'interprétation de leur relocalisation CP-dépendante. L'expression transitoire constitue certes un moyen de prédilection pour évaluer rapidement l'expression d'une protéine d'intérêt dans les plantes car elle n'est pas assujettie à des effets positionnels de la séquence codante et permet de hauts niveaux d'expression, mais ces derniers s'avèrent souvent inégaux d'une cellule à l'autre. L'intégration stable du transgène dans le génome de la plante régule généralement son expression et permet ainsi de s'affranchir de certains artefacts observés en expression transitoire. C'est donc la stratégie que j'ai adoptée afin de disposer d'un système produisant une expression de Cb généralisée et homogène *in planta*.

Des plantes ont été régénérées (Sparkes *et al*, 2006) à partir de cellules exprimant le Nb23:EGFP provenant de feuilles préalablement infiltrées avec des agro-bactéries contenant le vecteur pEAQHTDest3-Nb23:EGFP. La même approche a été utilisée en parallèle pour régénérer des plantes exprimant constitutivement la EGFP. Vingt-cinq lignées transgéniques indépendantes T0 ont été obtenues pour le Cb (lignées 23EG) et vingt-et-une lignées contrôles pour la EGFP (lignées EG), toutes viables, fertiles, globalement dépourvues de phénotype flagrant en comparaison avec des *N. benthamiana* sauvages et pour lesquelles la présence du transgène a été confirmée par PCR. L'expression du transgène a été sommairement évaluée dans chacun des transformants primaires par la mesure de la fluorescence de la EGFP présente au niveau des feuilles apicales [Figure 3.12]. Les niveaux d'accumulation de EGFP

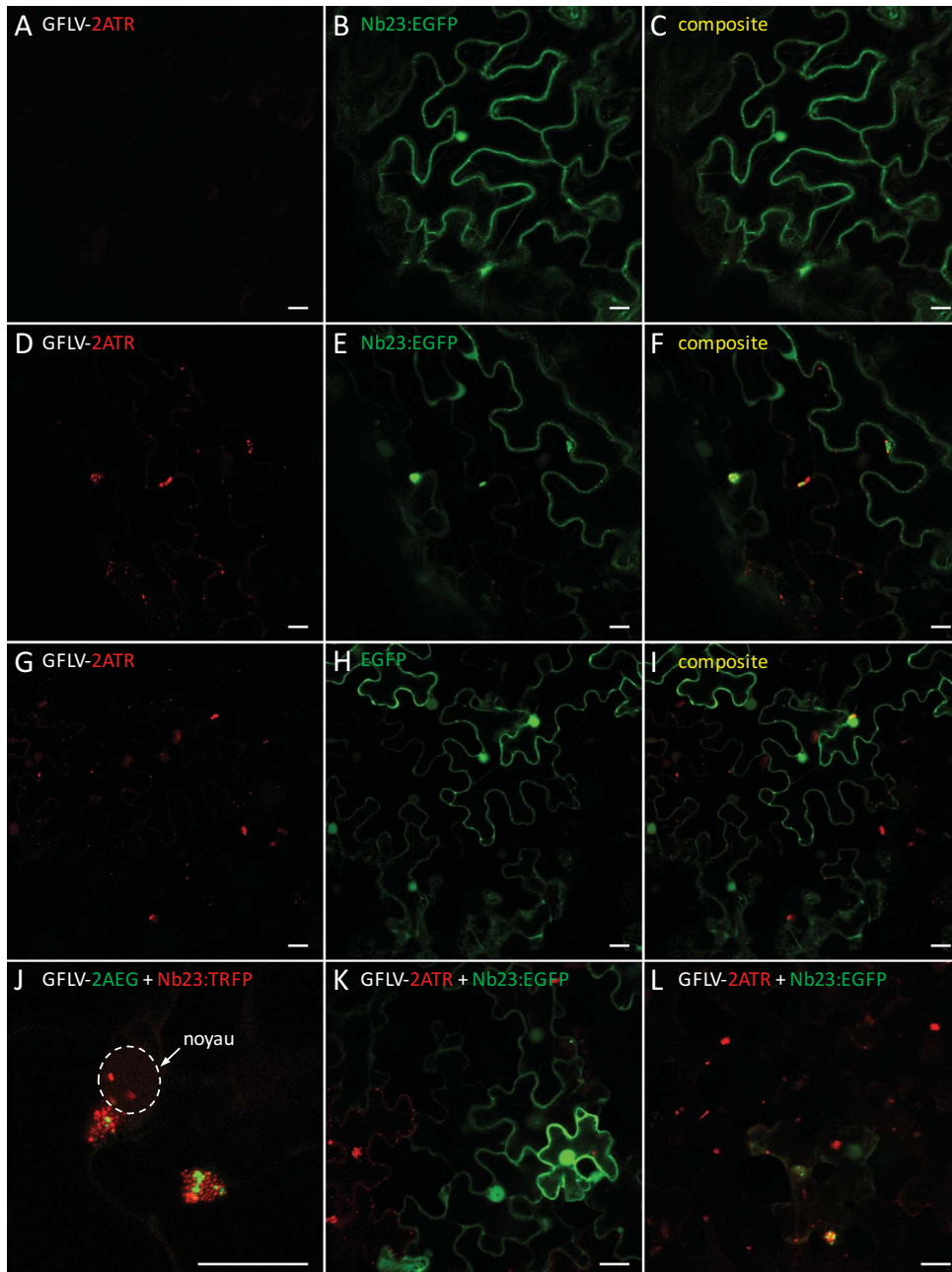


Figure 3.11 | Expression transitoire de Cb en contexte viral.

Exprimé transitoirement dans une plante infectée par le GFLV, le Cb passe d'une distribution nucléocytoplasmique diffuse observée en l'absence de virus (A, B, C) à une répartition sous forme d'agrégats dans les zones où le virus est présent (D, E, F). En détail agrandi, ces agrégats correspondent aux compartiments viraux où s'accumule la 2A lors de la multiplication du GFLV (J). Cette relocalisation de la fluorescence n'est pas induite lors de l'expression d'une protéine fluorescente libre (G, H, I) et dépend de la reconnaissance du GFLV par le Nb. Le potentiel d'utilisation des Cb pour le suivi du GFLV est limité en expression transitoire en raison de niveaux d'expression disparates entre les cellules (K) et plus importants dans l'épiderme (K) que dans le mésophile (L) où le virus se réplique préférentiellement. Les acquisitions ont été effectuées à partir de feuilles systémiques de *N. benthamiana* infectés avec du GFLV-F13 recombinant exprimant la TRFP (GFLV-2ATR) (Amari *et al*, 2010) (A à I, K, L) ou la EGFP (GFLV-2AEG) (J), 42 à 96 h après infiltration d'*A. tumefaciens* resuspendues à $A_{595\text{ nm}} = 0,1$ pour Nb23:EGFP et Nb23:TRFP et 0,4 pour EGFP, à l'aide (excepté J obtenu dans les mêmes conditions que la Figure 3.9) d'un microscope confocal LSM700 [ZEISS] équipé d'un objectif Plan-Apochromat 20x/0.8 avec une configuration *multi-track* ($\lambda_{\text{excitation}} = 488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 488\text{-}525\text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}} = 555\text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 560\text{-}615\text{ nm}$). C, F et I correspondent respectivement à la superposition de A et B, D et E, et G et H. L correspond au même champ que K capturé dans un plan optique plus profond. Barres d'échelle : 20 μm .

sont hétérogènes d'une lignée à une autre, signe de l'existence probable d'évènements de transformation indépendants et potentiellement d'une différence du nombre de copies du transgène insérées. L'accumulation des produits du transgène dans les lignées EG est, d'une manière générale, nettement supérieure à celle observée dans les lignées 23EG, la fluorescence émise par la plupart des lignées 23EG n'excédant souvent pas le bruit de fond mesuré avec une plante sauvage non transformée, ce qui pourrait refléter une expression plus faible ou une plus grande instabilité post-traductionnelle du Cb par rapport à la EGFP libre.

La descendance ségrégeante T1, obtenue par autofécondation des transformants primaires T0, a par la suite été confrontée à une infection virale par inoculation mécanique avec du GFLV-GHu purifié. Les résultats de ce phénotypage sont particulièrement intéressants puisque, tandis que la totalité des plantes issues des lignées EG sont sensibles au virus, la réponse des lignées 23EG varie. Il a ainsi été possible d'obtenir des lignées sensibles au GFLV et dont le Cb est relocalisé sous l'effet de l'infection, mais aussi des lignées résistantes au GFLV (cf Chapitre 4.2.1.2 : Figure S3). Au vu des implications biotechnologiques et fondamentales majeures de ces deux résultats, j'ai par la suite recentré l'essentiel de mes efforts de recherche sur la valorisation des Cb en tant que *biosensors* pour le suivi d'un virus dans son hôte et en tant que molécules antivirales.

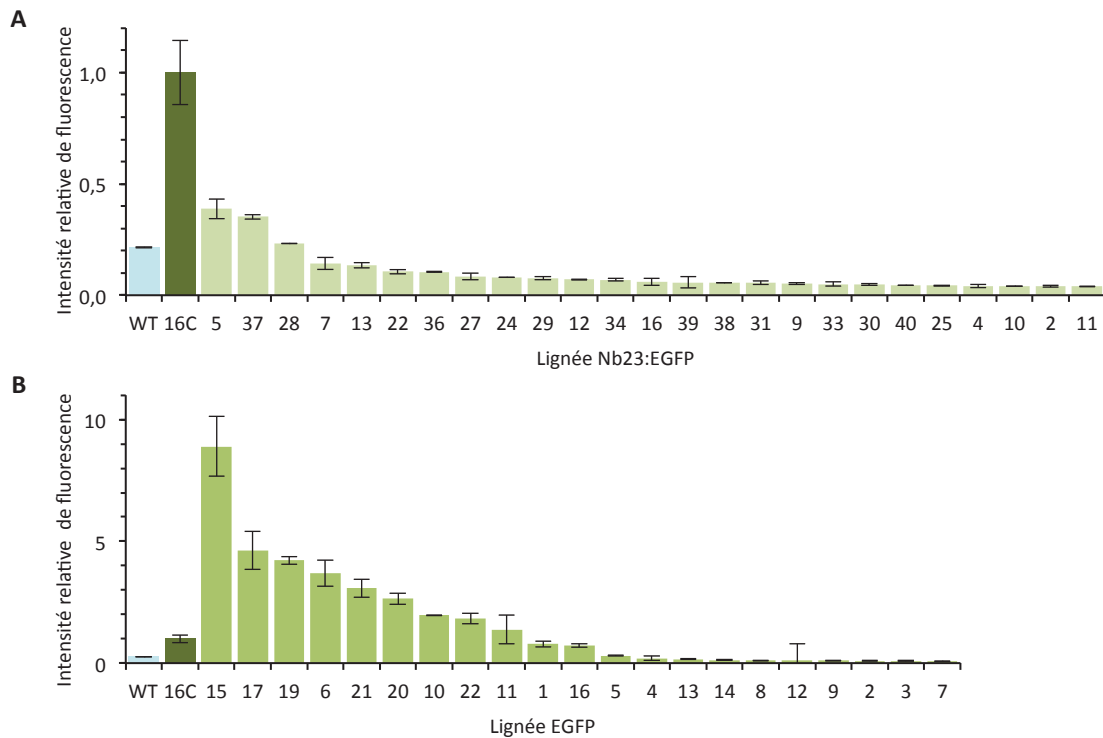


Figure 3.12 | Évaluation de la fluorescence des lignées transgéniques T0 Nb23:EGFP et EGFP.

Afin d'estimer rapidement les niveaux d'accumulation de Cb dans les lignées de *N. benthamiana* transformées, l'intensité de la fluorescence émise après excitation par chacune des 25 lignées exprimant le Nb23:EGFP (A) et par chacune des 21 lignées contrôles exprimant la EGFP (B) générées a été mesurée. L'intensité de fluorescence a été déterminée avec le logiciel Image J par le calcul du niveau de gris moyen des pixels contenus dans deux zones de même aire aléatoirement délimitées sur la photo d'un disque prélevé sur une feuille apicale et observé par microscopie à épifluorescence. L'histogramme représente l'intensité moyenne de la fluorescence mesurée pour chaque transformant primaire T0 au stade adulte rapportée à la fluorescence mesurée pour une plante GFP-16c (16C) (Ruiz *et al*, 1998) qui exprime constitutivement la mGFP5 (Haseloff *et al*, 1997) au niveau du réticulum endoplasmique. Les barres d'erreur représentent l'écart type entre les deux réplicats. Une plante sauvage (WT) a été utilisée comme contrôle négatif. Les niveaux d'expression de EGFP sont hétérogènes entre les lignées et en moyenne 17 fois plus faibles dans les lignées Cb que dans les lignées contrôles exprimant la EGFP. Note : pour un même nombre de molécules et une excitation à 488 nm, le signal de fluorescence détecté pour la EGFP est environ 8 fois plus intense que celui détecté pour la mGFP5.

Chapitre 4

Les Nanobodies induisent de la résistance au GFLV

1 Biotechnologies et résistance antivirale

Dans la lutte contre les virus phytopathogènes, le terme de résistance peut avoir des significations très diverses (Oliver & Fuchs, 2011). On qualifie spontanément de "résistantes", des plantes capables de bloquer la multiplication d'un virus en interférant avec son cycle infectieux (réplication, mouvement, transmission). On qualifie également souvent de "résistantes", des plantes sensibles à un virus mais qui ne manifestent pas les effets indésirables liés à l'infection par celui-ci (symptômes). Dans les deux cas, une gradation de la résistance, qui peut aller d'une immunité complète à un simple délai d'apparition de la maladie ajoute un niveau de complexité supplémentaire et les notions finissent alors par se rattraper. Pour le virologue, la résistance fait essentiellement référence au premier point, alors que le sélectionneur et l'ingénieur visent avant tout à se rapprocher du plus haut degré de résistance afin de minimiser l'impact économique des virus sur les cultures. Dans les approches biotechnologiques d'induction de résistance, un haut niveau de tolérance est généralement considéré comme suffisant, mais le risque que l'évolution de la population virale arrive à contourner la résistance à long terme conduit finalement les sélectionneurs à rejoindre l'objectif des virologues en cherchant à contrecarrer au maximum la multiplication du virus.

1.1 Contexte historique

Au cours des trois dernières décennies, l'impact des biotechnologies sur la pathologie végétale n'a cessé de croître pour pallier les limitations de l'hybridation conventionnelle pratiquée par l'homme depuis les débuts de la domestication des plantes. Cette révolution s'est amorcée au début des années 1980 avec l'obtention quasi simultanée des premières plantes génétiquement modifiées par deux groupes indépendants de l'université de Gand (Belgique) (De Block *et al*, 1984) et de la très controversée société de biotechnologie *Monsanto* (États-Unis) (Horsch *et al*, 1984). En mettant à profit les perspectives offertes par les travaux initiés sur l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* (bactérie du sol responsable des tumeurs de la galle du collet) pour intégrer des gènes étrangers dans le génome d'une cellule végétale (Herrera-Estrella *et al*, 1983; Zambryski *et al*, 1983; Fraley *et al*, 1983), ils sont parvenus à régénérer des plants de tabac, phénotypiquement normaux et sains, exprimant des gènes de résistance à des antibiotiques. Ils ont de plus démontré que la transmission du transgène aux générations suivantes respectait les lois de l'hérédité mendélienne ouvrant ainsi des horizons à l'ingénierie végétale.

1.1.1 Résistance dérivée du pathogène

Au même moment, Sanford et Johnston ont formulé le concept visionnaire de résistance dérivée du pathogène (*pathogen-derived resistance*, PDR) (Sanford, 1985) fondé sur le principe que l'expression dans un organisme hôte d'un gène ou d'une portion de gène dérivé d'un agent pathogène est susceptible

d'interférer avec sa multiplication et d'induire un phénotype de résistance si le produit du gène est présent sous une forme aberrante, en quantité excessive ou à un moment inopportun de son cycle de développement. Du fait du parallèle naturel, déjà connu, de la prémunition et du fait de la relative simplicité des génomes viraux, l'approche a été rapidement appliquée à la virologie végétale et dès lors, de nombreux programmes de recherche ont vu le jour pour tenter de générer de la résistance aux virus grâce à des plantes transgéniques exprimant des gènes viraux ou des séquences virales (pour revue voir Prins *et al*, 2008; Fuchs, 2009; Gottula & Fuchs, 2009; Reddy *et al*, 2009).

La première démonstration de la PDR appliquée aux phytovirus a été réalisée avec l'expression de la protéine de capsid (*capsid protein*, CP) du *Tobacco mosaic virus* (TMV) dans des tabacs transgéniques qui se sont révélés protégés contre l'infection par ce même virus (Powel Abel *et al*, 1986). Dans ce modèle, le degré de protection au TMV a été corrélé au niveau d'accumulation de la CP transgénique, il s'est avéré faible en cas d'inoculation avec de l'ARN viral et a été aboli à forte pression d'inoculum (Beachy, 1999), suggérant une intervention directe de la protéine transgénique dans des étapes précoces du cycle viral. Au final, en dépit d'une méconnaissance du mécanisme précisément impliqué, la résistance a été imputée à une inhibition de la décapsidation et de la réplication virale résultant de l'interaction de la CP codée par le transgène avec celle du virus challenger (Asurmendi *et al*, 2007; Bendahmane *et al*, 1997; 2007).

Des mécanismes similaires ont été décrits pour expliquer la résistance conférée par la même stratégie à de nombreux autres virus dont le *Potato virus X* (PVX) ou l'*Alfalfa mosaic virus* (AIMV) (Baulcombe, 1996). Cependant des travaux ultérieurs, utilisant notamment des tabacs résistants exprimant des séquences tronquées ou non-traductibles de la CP du *Tobacco etch virus* (TEV) (Lindbo & Dougherty, 1992b; 1992a), ont rapidement mis en évidence que la traduction du transgène n'était pas indispensable à l'induction de la résistance (Lindbo & Dougherty, 2005). Pour les phytovirus, la plupart des exemples de PDR reposent en effet sur un processus d'extinction de l'expression génique (*post transcriptional gene silencing*, PTGS) qui conduit à la dégradation spécifique des ARN messagers du transgène et du génome viral (Simón-Mateo & García, 2011). Cette découverte a permis d'élucider progressivement le mécanisme majeur du *gene silencing* qui est reconnu aujourd'hui comme un composant essentiel du système naturel de défense antivirale chez les plantes et plus universellement de la régulation de l'expression des gènes chez presque tous les eucaryotes.

1.1.2 Sources non virales de résistance par transgénèse

Des stratégies alternatives à la PDR tirant bénéfice, de la même façon, de la disponibilité de promoteurs et de techniques de transformation assurant l'introduction et l'expression constitutive de gènes dans les plantes, mais ne s'appuyant pas sur l'utilisation de séquences d'origine virale ont également été explorées au fil des années pour induire de la résistance aux virus par génie génétique (Reddy *et al*, 2009; Hull, 2014).

L'approche la plus intuitive est probablement l'expression par transgénèse de gènes naturels de résistance aux virus que ce soit pour accélérer le processus d'amélioration variétale, pour élargir le spectre et la durabilité de la résistance par empilement de différents gènes (*gene stacking*) dont l'introgession serait difficile en raison d'incompatibilités génétiques ou de liaison à des caractères indésirables, ou pour s'affranchir de la barrière des espèces qui limite l'hybridation conventionnelle (Whitham *et al*, 1996; Spassova *et al*, 2001). De plus, les avancées actuelles de la génomique et de la bioinformatique dans l'analyse fonctionnelle de ces gènes laisse entrevoir la possibilité de les modifier

pour moduler les voies de résistance ou créer de nouvelles sources de résistance (Farnham & Baulcombe, 2006; Gururani *et al*, 2012).

L'expression d'inhibiteurs naturels de la réplication virale telles que les protéines inactivant les ribosomes (*pokeweed anti-viral proteins*, PAP) (Van Damme *et al*, 2001) issues d'une plante herbacée de la famille des *Phytolaccaceae* a conduit à une protection large par rapport à plusieurs virus, incluant le *Cucumber mosaic virus* (CMV), le *Potato virus Y* (PVY) et le PVX dans *N. tabacum* (Lodge *et al*, 1993), mais pose des problèmes de cytotoxicité qui peuvent néanmoins être contournés par l'utilisation de formes modifiées non virulentes (Cao *et al*, 2011).

Une autre solution ayant été considérée est l'expression d'inhibiteurs de protéases pour bloquer l'activité de la protéase virale codée par de nombreux virus (*Comoviridae*, *Potyviridae*, *Closteroviridae*...), à fort impact économique, qui requièrent le clivage protéolytique d'un précurseur polyprotéique pour la libération de leurs protéines virales fonctionnelles. Des tabacs exprimant la cystatine du riz, un inhibiteur de protéases à cystéine, se sont ainsi montrés résistants au TEV et au PVY mais pas au TMV dont le cycle infectieux ne nécessite pas l'intervention d'une protéase (Gutierrez-Campos *et al*, 1999).

Par ailleurs, les biotechnologies permettent d'adopter des approches jusque-là complètement étrangères aux plantes. Depuis l'obtention des premiers anticorps dirigés contre des phytovirus, leur utilisation semblait possible pour protéger les plantes des infections virales. Bien que le système immunitaire lié à ces protéines chez les animaux n'existe pas dans le règne végétal, l'affinité des anticorps pour leur antigène peut être suffisante pour déstabiliser l'activité des protéines virales dans les plantes (De Jaeger *et al*, 2000). Pour obtenir l'expression d'anticorps complets fonctionnels, les premiers essais ont impliqué des croisements fastidieux entre des plantes exprimant séparément les chaînes lourdes et légères (Hiatt *et al*, 1989), mais le développement d'anticorps recombinants simple chaîne (*single chain variable fragment*, scFv) ainsi que celui de la technologie de *phage display* permettant de les sélectionner aisément contre une large gamme d'antigènes, même impropres à une immunisation, a considérablement simplifié le processus (Ziegler & Torrance, 2002). L'attrait de l'expression intracellulaire d'anticorps dans les plantes (*plantibodies*) réside pour beaucoup dans la possibilité de choisir avec précision la cible pour conférer des résistances très larges en visant des résidus protéiques hautement conservés entre différentes familles de virus (Boonrod *et al*, 2004; Fomitcheva *et al*, 2005) (cf Chapitre 4.1.2.4 : Expression de *plantibodies*).

Une extension de cette stratégie utilisant des aptamères peptidiques au lieu d'anticorps a été récemment tentée pour lutter contre les virus à ADN simple brin tels que les géminivirus. La protéine virale multifonctionnelle Rep (*replication associated protein*) est une cible intéressante car elle est fortement conservée au sein des membres de la famille des *Geminiviridae* et essentielle à leur réplication, notamment par l'interaction avec les polymérases de l'hôte. Des lignées transgéniques de tomates exprimant des aptamères se liant à des résidus conservés entre protéines Rep ont montré une atténuation des symptômes après inoculation du *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) et du *Tomato mottle virus* (ToMoV), deux géminivirus de quarantaine non apparentés (Reyes *et al*, 2013).

La majeure partie des phytovirus possèdent cependant un génome à ARN et forment de ce fait des intermédiaires de réplication avec une structure en ARN double brin. L'utilisation de ribonucléases, isolées de levure (Watanabe *et al*, 1995) ou dérivées d'interférons provenant du système antiviral des mammifères (Truve *et al*, 1993; Ehara *et al*, 1994), capables de dégrader spécifiquement ces intermédiaires, a permis d'induire une résistance au TMV, au CMV et au PVY dans des plants de tabac et au PVX dans des plants de pommes de terre.

Les phytovirus étant principalement transmis par l'intermédiaire d'un vecteur, une option pour bloquer la propagation du virus est d'interférer avec ce vecteur en affectant son comportement alimentaire ou sa survie ou en bloquant la transmission (Bragard *et al*, 2013). L'expression dans *N. benthamiana* d'un homologue de la protéine GroEL, la symbionine, qui interagit dans les aleurodes et les pucerons avec les particules de plusieurs virus à transmission persistante et circulante pour prévenir leur dégradation dans l'hémolymphe et pour assurer la transmission, a par exemple conféré une tolérance à l'infection par le TYLCV et le CMV (Edelbaum *et al*, 2009). Il a par ailleurs été démontré que la production d'ARN interférents dans les plantes peut freiner le développement de plusieurs types de vecteurs par induction de *gene silencing* (Duan *et al*, 2012). Cependant, arriver à altérer les capacités vectrices par ce moyen ou par l'expression de tout ou partie d'un récepteur viral qui pourrait entrer en compétition avec celui du vecteur est encore prématuré et requiert davantage de connaissances, notamment sur les récepteurs des virus de plantes dont, hormis pour quelques rares cas comme le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Uzest *et al*, 2007) ou le *Cucumber necrosis virus* (CNV) (Kakani *et al*, 2003; Li *et al*, 2013), on ne connaît même pas la nature biochimique

Un autre axe de recherche qui est encore à un stade relativement précoce est celui de la modulation de l'expression de facteurs de l'hôte impliqués dans le cycle viral. Cette méthode dépend directement de la capacité à identifier ces gènes, mais une fois caractérisés dans une espèce, des homologues peuvent souvent être exploités avec succès dans d'autres. Des tabacs *silencés* pour le gène HSP70 (Wang *et al*, 2009) ou pour les homologues d'*Arabidopsis thaliana* *TOM1* et *TOM3* (Asano *et al*, 2005; Chen *et al*, 2007) ont montré respectivement une réduction de la réplication du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) et une inhibition totale de la multiplication de plusieurs tobamovirus, cette dernière étant obtenue de la même façon par la surexpression de *TOM1* (Hagiwara-Komoda *et al*, 2008).

Malgré la multiplicité des pistes étudiées, la grande majorité des stratégies de défenses antivirales développées à ce jour, utilisant la biotechnologie, reposent sur la PDR dont l'application a généré avec succès de la résistance contre de très nombreuses familles de virus phytopathogènes. Il est souvent admis que les résistances non dérivées du pathogène peuvent potentiellement conférer une résistance plus large et plus durable que les stratégies basées sur le PTGS mais la plupart ne disposent pas de la facilité de conception et de la simplicité technique de ce dernier, ce qui restreint encore fortement leur utilisation pratique.

La résistance aux phytovirus induite par génie génétique peut, quelle que soit la stratégie considérée et bien que la limite entre les deux catégories soit très ténue, se diviser en résistance conférée par l'expression d'une protéine, d'une part, et en résistance conférée par l'expression d'ARN, d'autre part.

1.2 Résistance induite par les protéines

1.2.1 Expression de protéine de capsid

L'efficacité de la PDR validée avec le TMV (Powel Abel *et al*, 1986), le concept a été repris pour de nombreux autres virus et dans de nombreuses autres espèces végétales. L'approche, qui à l'origine reposait principalement sur l'expression de gènes entiers ou tronqués de la CP (Fitchen & Beachy, 1993), a ensuite été étendue à l'utilisation de séquences d'autres protéines virales (polymérase, protéine de mouvement, protéase...).

La tomate est la première culture d'intérêt agronomique à avoir bénéficié du potentiel pratique de la PDR. À l'issue de la toute première évaluation en plein champ de plantes transgéniques conçues pour

résister à une attaque virale, des tomates exprimant la CP du TMV se sont révélées considérablement moins symptomatiques que les plantes témoins après inoculation mécanique de souches distinctes de TMV (Nelson *et al*, 1988; Sanders *et al*, 1992). Pour autant, ni le processus de transformation, ni l'expression du transgène n'ont semblé affecter significativement les performances horticoles des plantes transgéniques et leur rendement en fruits s'est avéré similaire à celui de plantes non transformées saines. Par ailleurs, la capacité des gènes viraux à conférer une résistance contre la transmission des virus par leurs vecteurs naturels a été confirmée pour la première fois avec des concombres exprimant la CP du CMV pour lesquels l'incidence d'infection est apparue fortement réduite lors d'un essai hors confinement mettant en jeu une dose d'inoculum élevée due à la présence d'une population importante de pucerons virulifères (Gonsalves *et al*, 1992).

Le succès rencontré lors de ces premières tentatives réalisées en conditions naturelles d'infection virale et de croissance des plantes a rapidement conduit à une déréglementation et à la mise sur le marché de plusieurs OGM issus de cultures pour lesquelles la sévérité de la situation épidémique menaçait la pérennité du tissu agricole local et pour lesquelles les techniques d'amélioration classiques s'étaient jusqu'alors révélées impuissantes. Deux lignées de courges transgéniques développées pour résister au *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), au *Watermelon mosaic virus* (WMV) ou au CMV (Fuchs & Gonsalves, 1995; Fuchs *et al*, 1998; Tricoli *et al*, 1995) et des papayers transgéniques résistants au *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Gonsalves, 1998; Ferreira *et al*, 2002; Gonsalves, 2014) sont ainsi cultivés avec succès à des fins commerciales aux États-Unis depuis 1996 et 1998 respectivement (Fuchs & Gonsalves, 2007). Le cas de la lignée de courge CZW-3 (Accord, 1996) exprimant conjointement les CP du ZYMV, du WMV et du CMV illustre de plus l'opportunité inestimable offerte par la PDR d'induire simultanément une résistance vis-à-vis de plusieurs virus différents et d'apporter ainsi une solution au contrôle des infections mixtes fréquemment retrouvées au sein des cultures horticoles.

Dans les multiples études qui ont été publiées depuis que la PDR a été éprouvée en laboratoire et au champ, le degré de protection conféré par l'incorporation d'un gène de CP peut varier, pour un même virus, d'une simple atténuation ou d'un retardement des symptômes à une immunité totale (Morroni *et al*, 2008). La compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans la résistance induite par l'expression de CP reste aujourd'hui pour le moins très parcellaire et, sans grande surprise si l'on tient compte du caractère multifonctionnel des CP dans les cycles viraux, la nature de ces mécanismes semble aussi différer selon les pathosystèmes considérés (Prins *et al*, 2008). En outre, comme décrit pour des *N. benthamiana* contenant le gène de la CP du *Turnip crinkle virus* (TCV) la protection n'est souvent pas imputable à la seule CP mais résulte vraisemblablement de la combinaison d'une intervention de la protéine transgénique et du *silencing* induit par le transcrite de son gène (Vasudevan *et al*, 2008).

Des caractéristiques récurrentes associées à une protection assurée par l'expression de la CP se dégagent cependant de l'ensemble de ces études (Hull, 2014). Dans la majorité des cas, l'étendue de la protection est positivement corrélée au niveau de traduction de la CP et est inversement proportionnelle à la pression d'inoculation appliquée. Dans une certaine mesure, le spectre de résistance peut par ailleurs être large. Il concerne souvent différentes souches du virus dont la CP exprimée est dérivée et il n'est pas rare que la protection soit également efficace contre des virus apparentés comme cela a été démontré dans l'exemple de la résistance au PVY conférée à des tabacs par l'expression de la CP d'un autre potyvirus, le *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Dinant *et al*, 1998). Le nombre de copies du transgène insérées dans le génome de la plante a aussi son importance, comme illustré par l'analyse de la ségrégation de la lignée 63-1 de papayer résistant au PRSV, où l'augmentation du nombre de copies du

transgène a conduit à un renforcement du phénotype de résistance ainsi qu'à un élargissement de son spectre (Souza *et al*, 2005).

Globalement, l'expression de la CP est la stratégie antivirale biotechnologique qui pendant longtemps a été la plus utilisée et qui jusqu'il y a peu, avant l'autorisation au Brésil en 2011 de la culture de haricots résistants au *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Aragão *et al*, 2013), était la seule exploitée dans les OGM commercialisés. Elle ne peut pas pour autant être considérée comme une panacée car il est légitime de penser que dans plusieurs cas, comme pour les orangers confrontés au *Citrus psorosis virus* (CPsV), par exemple, la transformation avec le gène de la CP n'est pas parvenue à induire une protection satisfaisante (Zanek *et al*, 2008; Reyes *et al*, 2011), mais ces échecs sont rarement documentés.

1.2.2 Expression de réplicase

L'induction de résistance par l'utilisation de gènes codant pour la réplicase virale (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) a été démontrée pour la première fois de façon fortuite avec le TMV (Golemboski *et al*, 1990). Au cours d'une étude visant à élucider la fonction d'un cadre ouvert de lecture (*open reading frame*, ORF) inclus en aval du gène de la RdRp du TMV, des tabacs transformés avec la séquence correspondant à cette protéine ont montré une résistance à l'infection par le TMV qui était limitée à l'égard de souches virales homologues ou très voisines, mais qui contrairement à une résistance induite par la CP a été maintenue à des concentrations élevées d'inoculum. Le fait qu'elle ait été abolie suite à l'expression d'une réplicase tronquée (Carr *et al*, 1992) suggère que la protéine transgénique, bien que n'ayant jamais été détectée, est responsable du mécanisme de résistance, probablement en agissant en mutant dominant négatif. Toutefois, l'insertion d'un transposon bactérien dans le transgène (Donson *et al*, 1993) indique que l'expression d'une réplicase entière et/ou fonctionnelle n'est pas strictement nécessaire pour induire la résistance.

Les gènes de réplicase dérivés d'autres virus membres des tobra- (MacFarlane & Davies, 1992), potex- (Braun & Hemenway, 1992), poty- (Audy *et al*, 1994), alfamo- (Brederode *et al*, 1995) et cucumovirus (Anderson *et al*, 1992; Carr *et al*, 1994; Hellwald & Palukaitis, 1995; Azadi *et al*, 2011) se sont également révélés être des sources efficaces de résistance. Pour les tobnavirus, l'expression d'une région de la RdRp du *Pea early-browning virus* (PEBV) a ainsi protégé des *N. benthamiana* contre des doses élevées de deux isolats de PEBV mais également contre un autre tobnavirus, le *Broad bean yellow band virus* (BBYBV) (MacFarlane & Davies, 1992). Comme pour les plantes résistantes au TMV, la protéine n'a pas été détectée dans le tissu transgénique, mais l'inaptitude de formes mutantes ou potentiellement dysfonctionnelles du transgène à générer de la résistance évoque un mécanisme lié à la protéine. La même hypothèse peut être avancée pour les potex- et les potyvirus où la substitution d'un seul acide aminé dans le site catalytique de la réplicase (Longstaff *et al*, 1993) ou la délétion entière du site catalytique (Audy *et al*, 1994), respectivement, suffit à abolir la résistance vis-à-vis du virus considéré.

Le schéma d'une protection conférée par la RdRp intervenant au seul niveau protéique n'est toutefois pas toujours aussi explicite et les observations réalisées avec les alfamovirus ou les cucumovirus impliquent la mise en œuvre de mécanismes plus complexes et subtils. La résistance au CMV obtenue à partir de séquences dérivées de la réplicase 2a a été décrite comme susceptible aussi bien d'interférer avec le processus de réplication (Carr *et al*, 1994; Hellwald & Palukaitis, 1995) que de limiter le mouvement systémique (Wintermantel *et al*, 1997) ou de cellule à cellule (Nguyen *et al*, 1996).

L'ensemble des études démontre l'efficacité de la résistance dérivée de l'expression de la réplicase, mais la part réellement jouée par la protéine ou par son transcrite apparaît loin d'être évidente. Comme pour la résistance fondée sur l'expression de la CP, une véritable résistance conférée par la protéine elle-même s'additionne probablement, dans la majorité des cas, à un niveau de résistance basal conféré par l'ARN. Cibler la RdRp paraît avantageux dans la lutte antivirale, d'une part car inhiber la réplication qui est source de variations génétiques réduit l'apparition de contournants de la résistance et d'autre part car cibler des motifs conservés des réplicases diminue la probabilité que d'éventuels variants soient fonctionnels (Hull, 2014), et permet d'envisager une résistance potentiellement plus large qu'une stratégie reposant sur l'expression de la CP.

1.2.3 Expression de protéine de mouvement

Comparée aux stratégies de résistance dérivant de l'expression de la CP ou de la RdRp, l'expression de la protéine de mouvement (*movement protein*, MP) a la particularité de conférer une résistance beaucoup plus étendue, à partir d'un seul transgène. Cette résistance n'est toutefois induite que par l'expression de formes non fonctionnelles ou mutées de la MP. L'expression de la MP native n'a au mieux aucun impact sur la multiplication virale, mais entraîne généralement au contraire une augmentation de la sévérité de l'infection (Ziegler-Graff *et al*, 1991).

Le mouvement des potex-, carla-, hordei-, et certains furovirus est dépendant de trois ORF chevauchantes organisées en *triple gene block* (TGB) (Verchot-Lubicz *et al*, 2010). L'expression de formes mutantes de la protéine 13K du TGB du *White clover mosaic virus* (WCIMV) a conféré une résistance au WCIMV ainsi qu'à d'autres virus utilisant la stratégie TGB pour leur mouvement, mais pas au TMV qui assure son mouvement sous forme de ribonucléoprotéine (RNP) (Beck *et al*, 1994). De la même façon, un mutant de la protéine 12K du TGB du PVX a conféré une résistance au PVX et à d'autres virus à TGB malgré une faible similarité de séquence avec le transgène mais pas au potyvirus PVY (Seppänen *et al*, 1997).

Contrairement à ces deux exemples montrant une résistance étendue au-delà du virus dont le transgène est dérivé mais limitée à des virus partageant la même stratégie de mouvement, l'expression d'une MP dysfonctionnelle du TMV interfère avec le mouvement systémique du *Tobacco rattle virus* (TRV) qui est basé sur une stratégie RNP mais également avec celui du *Peanut chlorotic streak virus* (PCSV) et du *Tobacco ringspot virus* (TRSV) qui repose sur le passage des virions à travers des tubules (Cooper *et al*, 1995). Cette résistance à large spectre pourrait indiquer que les MP de plusieurs virus taxonomiquement différents interagissent avec des facteurs cellulaires communs et pourrait alors résulter d'un effet dominant-négatif des MP mutées.

1.2.4 Expression d'autres protéines virales

Le recours à d'autres protéines virales pour obtenir de la résistance, ciblant des protéines plus spécifiques à quelques familles de virus est plus anecdotique. En raison de l'impact économique de nombreux virus à ADN simple brin dans les pays en développement, les protéines Rep, nécessaires à leur réplication, ont parfois été utilisées (Reddy *et al*, 2009). Leur expression conduit, par un effet dominant négatif, à la formation de complexes dysfonctionnels qui inhibent la réplication virale des géminivirus ou des nanovirus, mais la résistance obtenue semble plutôt étroite et s'est parfois révélée instable (Lucioli *et al*, 2003; Prins *et al*, 2008). Les potyvirus expriment leur génome sous forme d'une polyprotéine maturée par les protéases virales, P1, HCPro et NIa. Des plantes transgéniques exprimant

Nla ont montré une résistance à une forte dose d'inoculum, mais cette résistance est restreinte au virus homologue (Maiti *et al*, 1993). L'intégrité du site actif de la protéase s'est révélé essentiel à l'induction de la résistance, mais l'activité seule de la protéase n'est pas suffisante pour conférer de la résistance au PVY (Mestre *et al*, 2003).

1.2.5 Expression de *plantibodies*

La première utilisation concluante d'anticorps recombinants pour générer de la résistance dans les plantes a conduit à une diminution de la sensibilité de *N. benthamiana* à l'*Artichoke mottle crinckle virus* (AMCV) grâce à l'expression constitutive de scFv dirigés contre la CP du virus (Tavladoraki *et al*, 1993). Les progrès sont ensuite restés timides, les scFv étant généralement instables dans l'environnement réducteur du cytoplasme qui est le compartiment cellulaire où se répliquent et s'accumulent la plupart des phytovirus. Un adressage vers la voie de sécrétion (Voss *et al*, 1995) et la rétention dans le réticulum endoplasmique (Fecker *et al*, 1997) ont permis de contourner ce problème et d'augmenter les rendements d'expression des anticorps, mais n'ont abouti qu'à une protection partielle respectivement contre le TMV et contre le *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). Une étude comparative a démontré qu'un scFv reconnaissant la CP du TMV était certes bien plus abondamment exprimé dans l'apoplasme que dans le cytoplasme, mais que son très faible niveau d'expression cytosolique était néanmoins suffisant pour avoir une plus forte incidence sur l'inhibition de la multiplication virale (Zimmermann *et al*, 1998) voire permettre une immunité totale (Bajrovic *et al*, 2001). Favoriser le contact entre le virus et les anticorps apparaît donc prépondérant pour obtenir un degré élevé de résistance, ce qui a été confirmé avec plusieurs scFv spécifiques de la CP de différents virus (pour revue voir Prins *et al*, 2008; Safarnejad *et al*, 2011).

La crainte que la variabilité génétique des CP de virus de plantes puisse limiter le spectre de résistance a par la suite conduit à privilégier l'expression de *plantibodies* dirigés contre des protéines virales non structurales généralement plus conservées. Cibler ces protéines qui sont nécessaires à la réplication ou au mouvement des virus, mais qui sont en général produites en moindre quantité que la CP réduit de plus le risque que la concentration d'anticorps soit insuffisante pour parvenir à une neutralisation complète de l'antigène viral. L'expression dans *N. benthamiana* d'un scFV reconnaissant un domaine hautement conservé de la réplicase du TBSV a ainsi conduit à l'obtention de plants transgéniques montrant de forts niveaux de résistance non seulement contre le TBSV mais également contre le CNV, le *Turnip crinckle virus* (TCV) et le *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV), qui représentent trois genres différents de la famille des *Tombusviridae* (Boonrod *et al*, 2004). Cette approche a été élargie avec l'isolement du scFv AC5j2R spécifique du motif Gly-Asp-Asp (*GDD box*) retrouvé dans le site actif de toutes les réplicases de virus à ARN simple brin positif (Fomitcheva *et al*, 2005). Ce scFv reconnaît *in vitro* des réplicases virales appartenant à plusieurs familles différentes (*Cucumoviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae* et *Flexiviridae*) mais sa capacité à induire de la résistance *in planta* n'a pas été déterminée.

Plus globalement encore, on peut imaginer que des anticorps capables de se lier aux structures d'ARN double brin qui sont formées lors de la multiplication de tous les virus à ARN positif, c'est-à-dire l'écrasante majorité des virus de plantes, pourrait permettre d'obtenir une résistance à très large spectre. Dans cet esprit, un scFv dérivé de l'anticorps monoclonal J2 reconnaissant l'ARN double brin indépendamment de sa séquence nucléotidique et inhibant la réplication *in vitro* de l'AIMV a été utilisé pour transformer *N. tabacum* (Morgun, 2005). Le scFv n'a conféré aucune protection suite à l'inoculation du PVY, mais a provoqué au contraire un accroissement de la sévérité des symptômes, traduisant probablement une influence directe sur le processus de *silencing* déclenché par l'infection. De plus, cet effet n'a été observé

que dans les lignées exprimant le scFv confiné au lumen du réticulum endoplasmique, ce qui, considérant la réplication cytoplasmique du PVY, suscite des interrogations quant au mécanisme mis en jeu et reflète un manque de stabilité de cet anticorps recombinant dans le cytoplasme.

Promouvoir l'expression et un repliement efficace des *plantibodies* dans les conditions sub-optimales du cytoplasme demeure sans conteste le principal défi de cette stratégie antivirale. Moins de 1 % des scFv sont stables lorsqu'ils sont exprimés dans le cytosol et seulement 0,1 % sont à la fois stables et fonctionnels (Maur *et al*, 2004; Visintin *et al*, 2004). Des niveaux d'accumulation élevés, pouvant atteindre jusqu'à 8 % des protéines solubles totales, ont pourtant parfois été rapportés (Zhang *et al*, 2008), suggérant que certains scFv possèdent intrinsèquement des déterminants structuraux critiques pour leur stabilité dans le cytosol des cellules végétales (Safarnejad *et al*, 2011). Fort de ce constat, une lignée transgénique de tomate totalement résistante au CMV a été obtenue par la sélection d'un scFv spécifique de la CP de ce virus à partir d'une banque phagique construite par évolution moléculaire autour d'une unique charpente protéique thermodynamiquement stable (Villani *et al*, 2005; 2008). Dans une autre approche, l'expression dans la pomme de terre d'un fragment d'anticorps à domaine unique (*single domain antibody*, sdAb) formé de la seule région variable VH de la chaîne lourde d'un scFv dirigé contre la protéase NIa du PVY n'a par contre induit qu'une atténuation des symptômes (Bouaziz *et al*, 2009) alors que l'expression du scFv complet a résulté en une résistance absolue (Ayadi *et al*, 2012).

La stabilité naturelle des Nb, y compris dans les conditions réductrices du cytoplasme, les positionne comme une alternative particulièrement prometteuse pour pallier les faiblesses des scFv en tant que *plantibodies*. Leur utilisation comme molécule antivirale est amplement documentée dans le monde animal (pour revue voir Vanlandschoot *et al*, 2011; Lopez Cardoso *et al*, 2012) et s'est révélée efficace contre des virus très variés (Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Strokappe *et al*, 2012), Rabies virus aG (RABV aG) (Boruah *et al*, 2013), Influenza A virus H5N1 (Cardoso *et al*, 2014), Herpes simplex virus 2 (HSV-2) (Geoghegan *et al*, 2015), *Hepatitis C virus* (HCV) (Tarr *et al*, 2013), *Human papillomavirus* (HPV) (Minaeian, 2012), *Foot and mouth disease virus* (FMDV) (Harmsen *et al*, 2008), *Respiratory syncytial virus* (RSV) (Schepens *et al*, 2011)...). Dans le monde végétal, la capacité d'un Nb à neutraliser le *Broad bean mottle virus* (BBMV), *in vitro* avant son inoculation sur *Vicia faba* ou *in vivo* par expression transitoire, a été très récemment mentionnée (Ghannam *et al*, 2015), mais l'applicabilité des Nb au développement de plantes résistantes reste à démontrer.

Comme pour toute stratégie antivirale induite par une protéine, l'expression simultanée de plusieurs anticorps recombinants avec des spécificités différentes devrait permettre d'élargir le spectre de la résistance (Schillberg *et al*, 2001). La possibilité de multimériser les fragments d'anticorps, présente l'avantage de pouvoir augmenter facilement l'avidité ou le spectre de reconnaissance à partir d'un seul transgène. Bien que prometteuse, la stratégie *plantibodies* est encore peu adoptée, souffrant probablement du caractère multidisciplinaire de l'approche qui nécessite des connaissances spécifiques et des investissements élevés aux premiers stades de la sélection des anticorps. La communauté scientifique redoute des problèmes d'acceptabilité en raison de l'origine animale des protéines exprimées.

1.3 Résistance induite par l'ARN

Des effets initialement inexplicables, observés lors de l'utilisation d'approches de PDR impliquant des protéines tronquées ou des séquences virales non codantes, ont rapidement mis en évidence que de nombreuses résistances aux virus ne reposaient finalement pas sur l'expression d'une protéine virale mais

correspondaient à des phénomènes induits par des mécanismes impliquant l'ARN. L'objectif de ce paragraphe n'est pas de dresser une liste exhaustive de toute la littérature scientifique portant sur la résistance induite par l'ARN dans les plantes, mais plutôt d'illustrer à l'aide de quelques exemples significatifs, les différentes approches de type PTGS déployées à ce jour pour conférer une résistance antivirale aux plantes. Celles-ci peuvent se répartir sommairement en deux catégories principales, la stratégie petits ARN interférents (*small interfering RNA*, siRNA) et la stratégie micro ARN artificiels (*artificial micro RNA*, amiRNA) qui font toutes deux appel au clivage d'ARN double brin (*double-strand RNA*, dsRNA) en petits ARN non codants (*small RNA*, sRNA).

1.3.1 Mécanisme du PTGS dans les plantes

Le *RNA silencing* est un mécanisme de régulation génétique conservé chez tous les eucaryotes. Dans les plantes, il peut intervenir à un niveau transcriptionnel (*transcriptional gene silencing*, TGS) par la méthylation des histones et de l'ADN ou intervenir à un niveau post-transcriptionnel (PTGS) par clivage ou répression traductionnelle des ARN cibles (pour revue voir Brodersen & Voinnet, 2006; Parent *et al*, 2012; Ghoshal & Sanfaçon, 2015; Csorba *et al*, 2015). Le *silencing* participe à la régulation de la physiologie et du développement de la plante, réprime la prolifération d'éléments transposables et est impliqué dans les réponses aux stress environnementaux (Baulcombe & Dean, 2014). Son rôle dans la défense antivirale est également largement démontré chez les plantes (Wang *et al*, 2012; Pumplin & Voinnet, 2013) et des éléments récents décrivent une fonction similaire chez les mammifères (Cullen *et al*, 2013; Maillard *et al*, 2013).

Le PTGS est un mécanisme cytoplasmique d'extinction génique déclenché par la reconnaissance de dsRNA qui cible des séquences d'ARN simple brin (*single strand RNA*, ssRNA) homologues [Figure 4.1]. Les dsRNA qui peuvent provenir d'origines diverses (intermédiaires de réplication virale, produits de polymérase de l'hôte, régions fortement structurées de ssRNA viraux, constructions transgéniques formant un ARN en tige boucle (*hairpin RNA*, hpRNA)...) sont pris en charge et fragmentés en duplex de sRNA d'environ 25 nucléotides de long par une endoribonucléase de type III appelée *DICER-like* (DCL) dans les plantes. Les duplex formés sont stabilisés et protégés de la dégradation par la méthylation de leur extrémité 3' par la protéine *HUA Enhancer 1* (HEN1). L'un des deux brins s'associe par la suite avec un membre de la famille protéique Argonaute (AGO) et guide le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*) auquel il s'incorpore vers les ARN de séquence complémentaire pour les dégrader ou inhiber leur traduction. Des ARN polymérase ARN-dépendantes (*RNA-dependent RNA polymerases*, RDR) orchestrent une phase d'amplification du PTGS ce qui conduit à la synthèse de sRNA secondaires qui participent à la propagation du signal de *silencing* dans toute la plante.

La plante modèle *A. thaliana* code pour quatre DCL dont l'activité nécessite cinq cofacteurs (*double-stranded-RNA-binding proteins*, DRB), pour dix AGO et pour six RDR. Par alignement de séquences, quatre gènes homologues de DCL ont également été retrouvés dans le génome de *V. vinifera* (Velasco *et al*, 2007). Ces protéines possèdent des rôles partiellement redondants et s'associent pour générer différentes classes de sRNA. Les sRNA identifiés chez les plantes incluent notamment les siRNA et les micro ARN (*micro RNA*, miRNA). Les siRNA résultent du clivage séquentiel d'un dsRNA effectué essentiellement par DCL2 et DCL4 qui induit leur accumulation sous forme de population ayant des séquences différentes [Figure 4.1 | A]. Les miRNA sont transcrits par la *RNA polymerase II* endogène et maturés par DCL1 avant d'être exportés du noyau vers le cytoplasme [Figure 4.1 | B]. Les stratégies de lutte antivirale basées sur le PTGS visent à produire des sRNA de ces deux types.

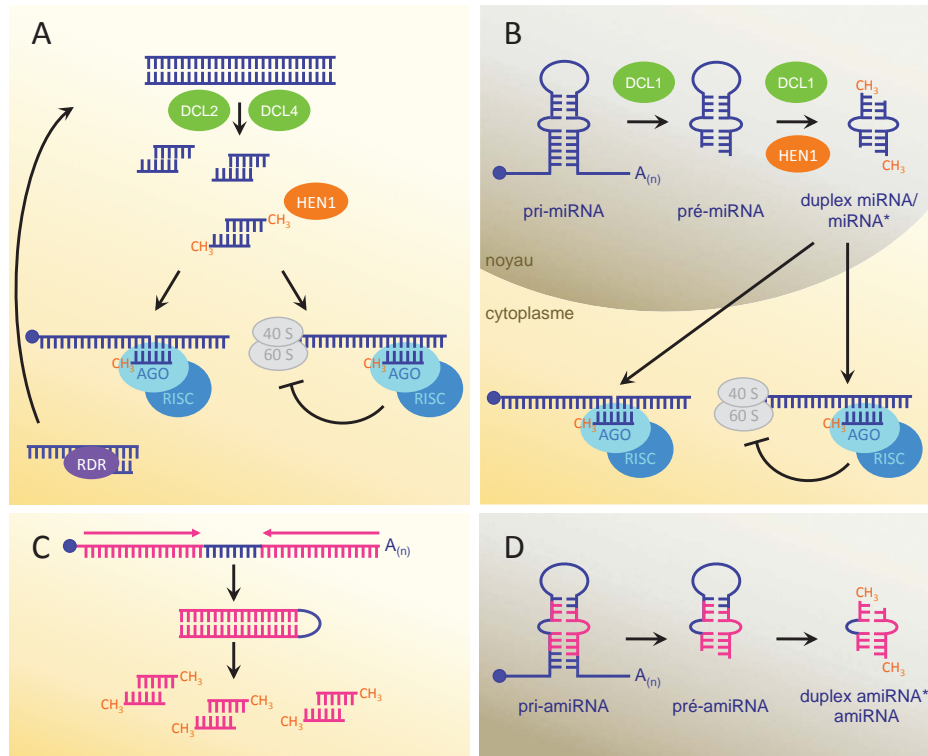


Figure 4.1 | Biogenèse et mécanisme d'action des sRNA (A, B) mimés pour générer de la résistance aux virus (C, D).

A. L'ARN double brin est clivé séquentiellement par DCL2 ou DCL4 en une population de siRNA double brin présentant une extrémité 3' sortante de deux nucléotides, méthylés par HEN1. L'un des deux brins est chargé par une protéine AGO dans le complexe RISC et sert de guide, de façon séquence-spécifique, pour inhiber la traduction d'un ARN messager cible ou pour induire son clivage et sa dégradation. Les fragments d'ARN produits peuvent servir de matrice et/ou d'amorce pour une nouvelle synthèse d'ARN double brin par des RDR endogènes en une étape d'amplification du phénomène et de synthèse de siRNA secondaires. **B.** Le pri-miRNA transcrit par l'ARN polymérase II est coupé par DCL1 en pré-miRNA puis en un duplex, constitué d'un brin guide et d'un brin passager (miRNA/miRNA*), méthylé et exporté dans le cytoplasme. Le miRNA chargé dans AGO guide le complexe RISC vers l'ARN cible pour inhiber sa traduction ou induire sa dégradation. **C.** Les constructions dites *hairpin* visent à la synthèse d'un ARN contenant des séquences virales (en rose) inversées répétées et séparées par un espaceur favorisant la formation d'une structure en double brin, substrat de DCL. **D.** Dans la stratégie dite amiRNA, le gène codant pour un miRNA endogène est modifié de façon à remplacer la séquence d'un miRNA endogène par une séquence complémentaire à l'ARN viral tout en conservant la structure secondaire des pri- et pré-miRNA indispensables à leur maturation par DCL1.

1.3.2 Stratégie hpRNA source de siRNA

Pour générer des siRNA, différentes sources de dsRNA ont été exploitées : des ARN sens ou anti-sens, mais surtout des séquences inversées répétées (souvent séparées par un intron) capables de former des hpRNA [Figure 4.1 | C]. L'efficacité de cette stratégie peut varier, mais dépend surtout de la similarité de séquence existant entre le transgène et le virus entrant (idéalement supérieure à 80 à 90 %) et de la longueur du transgène (idéalement 100 à 800 paires de bases) (Simón-Mateo & García, 2011; Duan *et al*, 2012). Elle augmente également avec le nombre de copies du transgène insérées dans la plante. Par exemple, des *Solanum tuberosum* transgéniques exprimant des séquences inversées répétées de la région terminale du gène codant pour la CP du PVY ont montré une forte résistance à trois souches différentes du virus (Missiou *et al*, 2004). Dans le cas du Plum pox virus (PPV), des *Prunus domestica* avaient été transformés avec le gène codant pour la CP conduisant à l'obtention de la lignée C5 hautement

résistante, commercialisée sous le nom "*Honey sweet*" aux États-Unis (Scorza *et al*, 2013). L'étude du mécanisme de cette résistance, révélant la présence caractéristique de siRNA, a prouvé qu'elle reposait en réalité sur un mécanisme d'extinction génique. L'efficacité du *silencing* contre ce virus a alors conduit au développement plus récent de constructions *hairpin* à partir de séquences non traductibles ou conservées couvrant tout le génome puis combinant des séquences provenant de six virus différents infectant *Prunus* spp (Liu *et al*, 2007; Ilardi & Tavazza, 2015). L'avantage du système hpRNA réside en effet dans la possibilité de créer facilement des transgènes chimères pour conférer une résistance simultanée à plusieurs virus.

1.3.3 Stratégie amiRNA

À condition de conserver la structure secondaire des précurseurs de miRNA endogènes, des modifications de séquences peuvent être introduites pour générer des amiRNA de 21 nucléotides capables de cibler des séquences virales [Figure 4.1 | D]. Par exemple, le précurseur du miRNA 159 d'*A. thaliana* a été modifié pour contenir des séquences complémentaires des séquences des suppresseurs de *silencing* du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) et du *Turnip mosaic virus* (TuMV) et de la séquence de la CP du TuMV (Niu *et al*, 2006). Lorsqu'ils sont exprimés de façon stable dans *A. thaliana*, ces trois amiRNA confèrent chacun de la résistance vis-à-vis de leur virus respectif. Une résistance simultanée vis-à-vis des deux virus a été obtenue à l'aide d'un précurseur dimérique d'amiRNA illustrant la possibilité d'élargir facilement le spectre de résistance comme avec la stratégie hpRNA. De façon intéressante, ces plantes transgéniques affichent une résistance spécifique suite à l'inoculation du virus dont dérive la séquence amiRNA même en dessous de 15 °C, une température généralement connue pour compromettre le PTGS (Szittyá *et al*, 2003). À partir du même précurseur miRNA 159, une résistance au *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) et au CMV a été plus récemment obtenue respectivement dans *N. benthamiana* (Kung *et al*, 2011) et *Solanum lycopersicum* (Zhang *et al*, 2010).

1.4 Polémiques autour des plantes transgéniques

La transgénèse est une technique d'amélioration variétale qui, par rapport à l'hybridation conventionnelle, présente l'avantage d'être ciblée ce qui induit moins de perturbations du génome et donc potentiellement moins de risques d'altération des qualités agronomiques, nutritionnelles ou organoleptiques. Elle constitue par ailleurs la seule alternative de lutte antivirale lorsqu'aucun gène de résistance n'est identifié ou exploitable. Elle dépend en revanche directement de la législation adoptée par chaque pays et se heurte souvent à un fort rejet de la part de la société. En France, alors que l'importation de nombreux produits OGM est autorisée, leur culture en plein air est interdite et la mise en place d'un essai expérimental hors confinement est soumise à d'écrasantes réglementations qui pour autant n'apportent pas de garantie contre le risque de voir les recherches anéanties du jour au lendemain par l'agissement d'activistes, comme ce fut le cas pour la parcelle expérimentale court-noué de l'Inra de Colmar, saccagée le 15 août 2010.

La perception sociétale des plantes transgéniques évoluera certainement avec la multiplication d'exemples de cultures transgéniques performantes à impact positif réussies. La culture de papayer exprimant le gène de la CP du PRSV témoigne aujourd'hui de l'efficacité d'une approche transgénique bien réalisée (Ferreira *et al*, 2002). Outre la restauration de l'équilibre socio-économique de l'archipel d'Hawaï, elle a permis de conserver la diversité variétale et, en réduisant la pression virale, a contribué

de façon plus inattendue à la réintroduction de papayers non transgéniques dont la culture était devenue impossible. La constante augmentation depuis 1996 des surfaces où sont cultivées des plantes transgéniques dans le monde, encore plus marquée dans les pays en développement (Clive, 2014), tend à prouver que le besoin et l'efficacité peuvent dominer les inquiétudes attisées par les opposants.

L'acceptation de la transgénèse dépendra également certainement de l'effort de communication que les scientifiques devront continuer à faire pour contrer la diabolisation menée par les obscurantistes. Les risques environnementaux ont été extensivement étudiés et ont permis d'écarter de nombreuses sources d'inquiétude et de définir les points nécessitant une vigilance particulière (Fuchs & Gonsalves, 2007). Le caractère contre-nature ou dangereux pour la consommation souvent attribué aux plantes transgéniques peut également être fortement remis en question par l'identification de séquences de T-DNA "naturelles" dans plus de 291 cultivars de patate douce (Kyndt *et al*, 2015).

Dans tous les cas une recherche académique compétitive associée à une expertise des applications pratiques de la transgénèse semble primordiale pour pouvoir maîtriser les enjeux des biotechnologies dans l'agriculture. Sans la poursuite de cette connaissance qui, sous la pression des lobby anti-OGM, est chaque jour un peu plus remise en question par les politiques, les cultures transgéniques risquent de se multiplier en dehors de tout cadre législatif. Des séquences transgéniques non autorisées d'origine inconnue dérivant d'isolats de PRSV provenant de Thaïlande ont par exemple été récemment détectées sur le marché japonais dans des papayes déshydratées (Nakamura *et al*, 2014). Avec les avancées des nouvelles technologies de transgénèse notamment de type CRISPR/Cas9 (Jinek *et al*, 2012; Bortesi & Fischer, 2015), permettant des insertions "chirurgicales" sous des promoteurs endogènes, les nouvelles générations de plantes transgéniques pourraient même devenir indécélables.

1.5 Résistance au GFLV

Dans le cas du GFLV, la plante hôte apporte un degré particulier de complexité dans l'obtention de plantes résistantes. Étant une plante pérenne, la vigne assure un contact long avec le virus, offrant ainsi une plus grande opportunité d'adaptation au virus. Pour être durable, la résistance au virus doit donc limiter au maximum les possibilités d'évolution de la population virale. De plus, étant une plante ligneuse, la vigne possède des stades juvéniles longs, une caractéristique qui ralentit les programmes classiques d'hybridation (Souza *et al*, 2007). Enfin, aucune source de résistance aux virus n'a été identifiée à ce jour dans *Vitis* spp (Oliver & Fuchs, 2011), excluant toute possibilité d'introgression d'un gène de résistance par hybridation. C'est pourquoi les tentatives d'obtention de plantes résistantes au GFLV ont reposé sur la transgénèse, la difficulté de transformer la vigne étant compensée par la haute valeur ajoutée des produits qui en dérivent.

1.5.1 Expression de CP

Dans un premier temps la PDR basée sur le gène 2C^{CP} a été testée dans *N. benthamiana* (Bardonnnet *et al*, 1994) et a conduit à un retard significatif de l'infection systémique suite à l'inoculation du GFLV mais pas de l'ArMV. Cette construction traductible puis d'autres constructions, traductibles et non traductibles, en orientation sens ou antisens, ont ensuite été introduites dans différentes variétés de vigne par différentes équipes (pour revue voir Laimer *et al*, 2009). Cependant l'évaluation de la résistance au GFLV dans son hôte naturel reste longue et fastidieuse, essentiellement en raison des difficultés rencontrées pour maîtriser son inoculation à la vigne. Le développement de clones infectieux de GFLV agro-inoculables à la vigne permettrait de faciliter les études, mais en attendant, la résistance a été évaluée par différents moyens allant

de l'électroporation de protoplastes (Valat *et al*, 2006) à des essais au vignoble en passant par la culture en bacs, en présence de nématodes, en serre confinée. Malgré des résultats variés et quelquefois prometteurs (Vigne *et al*, 2004; Valat *et al*, 2006), cette stratégie n'a pas permis de développer des vignes réellement résistantes au vignoble, la protection conférée n'étant finalement que très limitée et n'ayant conduit, au mieux, qu'à un retard d'apparition de la maladie (Gambino *et al*, 2010; Hemmer *et al*, 2009). Une expérimentation à ciel ouvert menée sur trois ans en Champagne a cependant permis d'étudier l'impact environnemental de porte-greffes transgéniques et a démontré que l'expression du transgène ne favorisait pas l'apparition de virus recombinants (Vigne *et al*, 2004). Après la construction de ces premières lignées transgéniques réalisées avant la découverte du *gene silencing*, de nouvelles constructions ont été élaborées avec pour objectif de générer de la résistance par PTGS.

1.5.2 Stratégie hpRNA, amiRNA

Les constructions visant à la fois à induire de la résistance par *RNA silencing* et à réduire l'accumulation de produits viraux (susceptibles d'entraîner de la recombinaison ou de l'hétéroencapsidation avec un virus entrant) font appel aux stratégies hpRNA et amiRNA (Jardak-Jamoussi *et al*, 2009; Jelly *et al*, 2012; Djennane *et al*, 2013). Deux amiRNA ciblant le gène de la 2C^{CP} ont été exprimés transitoirement dans des embryons somatiques de vigne en présence d'une construction *sensor* permettant d'en vérifier l'efficacité (Jelly *et al*, 2012). La construction en *hairpin* visant à produire des siRNA consiste en une séquence inversée répétée dans une région conservée du gène de la 2B^{MP}. Cette construction a permis d'obtenir de la résistance en hôte herbacé et a été transférée dans la vigne en vue de vérifier sa capacité à générer du *silencing* et de la résistance au GFLV (Jardak-Jamoussi *et al*, 2009).

1.5.3 Expression de scFv

Une approche n'exploitant pas de sources dérivées du pathogène mais reposant sur l'expression d'anticorps recombinants de type scFv a également été validée dans *N. benthamiana* (Nölke *et al*, 2009). Des scFv dirigés contre la 2C^{CP} du GFLV confèrent de la résistance (diminution du nombre de plantes infectées et diminution du titre viral dans les plantes infectées) à la fois au GFLV et à l'ArMV (Nölke *et al*, 2009). Cette étude constitue la seule documentation d'une approche biotechnologique montrant une protection croisée à la fois contre le GFLV et l'ArMV. Dans cette étude, l'activité antivirale procurée par le scFv s'est avérée dose-dépendante avec une résistance atteignant 100 % des plantes inoculées pour une accumulation des scFv dépassant 0,1 % des protéines solubles totales. Ce principe de protection par des *plantibodies* n'a été validé ici que dans l'hôte herbacé *N. benthamiana* mais une approche similaire conduite avec le *Citrus tristeza virus* (CTV) illustre le potentiel de cette approche dans des plantes ligneuses (Cervera *et al*, 2010).

2 Résistance au GFLV induite par l'expression de Nanobodies

2.1 Valorisation par publications écrites

2.1.1 Des résultats, un brevet et un article

La confrontation à grande échelle des lignées transgéniques de *N. benthamiana* exprimant le Nb23:EGFP avec le GFLV a mis en évidence un phénotype de résistance au virus. Considérant

L'importance des perspectives agronomiques et économiques émanant de cette observation, j'ai consacré la fin de ma thèse à approfondir ce nouveau volet du projet. La stabilisation de trois lignées homozygotes, dont deux exprimant le Nb23:EGFP et une lignée contrôle exprimant la EGFP, a permis de caractériser en détail cette résistance et de confirmer qu'elle est directement liée à la reconnaissance spécifique du GFLV par le Cb. En effet, si la protection s'est avérée très efficace contre le GFLV suite à l'inoculation mécanique de huit isolats naturels différents ou d'ARN viraux et aussi suite à la mise en contact des racines avec des nématodes virulifères, aucune protection croisée vis-à-vis de l'ArMV n'a été observée. Au cours de ces tests impliquant plus de 450 plantes, une lignée s'est révélée de façon remarquable complètement immune à l'infection par le GFLV. Sous une forte pression d'inoculum, la résistance a toutefois été partiellement levée conduisant à l'émergence de souches mutantes de GFLV pour lesquelles le Nb23 possède une affinité réduite, suggérant un mécanisme de contournement de la résistance par échappement du virus à la reconnaissance par le Nb. L'analyse structurale du complexe Nb23/GFLV, corrélant la position de toutes les mutations identifiées avec la zone de contact du Nb23 sur la capsid, a permis d'asseoir cette hypothèse. De plus, cette zone est située à proximité immédiate des déterminants de la spécificité de transmission du GFLV déjà décrits (Schellenberger *et al*, 2010; 2011; Belval *et al*, 2015). L'examen de la transmissibilité par nématodes a révélé qu'au moins un des mutants caractérisés n'est absolument plus transmis par *X. index*, indiquant que l'épitope du Nb23 joue probablement un rôle important dans la transmission du virus par son vecteur naturel. Sur la base de ces résultats expérimentaux originaux et prometteurs, la rédaction d'une demande de brevet et celle d'un article ont été initiées, rédactions auxquelles j'ai pris part.

Le brevet EP 14305100 "*Resistance to Grapevine fanleaf virus*" a fait l'objet d'un premier dépôt le 24 janvier 2014 pour protéger au niveau européen les séquences des cinq Nb issus de la famille majoritaire à laquelle appartient le Nb23. Il comporte comme revendication principale le recours à une méthode permettant de conférer ou d'accroître la résistance d'une plante au GFLV par l'expression constitutive ou par le transfert de fragments d'anticorps à chaînes lourdes reconnaissant le même épitope que le Nb23. Le rapport préliminaire émis par l'Office européen des brevets a reconnu d'emblée le caractère nouveau de l'ensemble des revendications dans la lutte contre le court-noué, mais a sollicité des clarifications pour en justifier l'activité inventive en regard de la description antérieure de scFv produisant un effet antiviral similaire (Nölke *et al*, 2009). Ce point a été éclairci par la mise en évidence d'une résistance moindre ou inexistante conférée respectivement par l'expression constitutive du Nb122:TRFP et du Nbp59:TRFP dans des *N. benthamiana* qui ont été générés par Kamal HLEIBIEH dans le but de valoriser les Cb en tant que *biosensors* du GFLV afin d'étudier les stades précoces de l'infection et de la transmission.

Malgré la profusion de résultats accumulés, une première version d'un manuscrit a été rédigée dans un format délibérément court de type *letters* ou *reports*. Ce parti pris s'inscrit dans l'optique de viser une publication dans un journal généraliste afin d'atteindre l'audience la plus large possible et de positionner ces travaux en pionniers pour une lutte antivirale innovante chez les plantes. La majeure partie du manuscrit présente de façon aboutie l'ensemble des résultats concernant la caractérisation biologique et moléculaire de la résistance induite par le Cb. Dans l'autre partie, figurent les résultats, restant à compléter, de l'étude structurale de l'interaction du Nb avec la particule virale qui a été réalisée en collaboration avec Bruno KLAHOLZ (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, IGBMC, Illkirch). Les prérequis pour la réalisation de cette étude, à savoir les conditions d'obtention de complexes Nb23/GFLV solubles, ont été déterminés par Léa ACKERER grâce à la collaboration avec Bernard LORBER (Institut de biologie moléculaire et cellulaire, IBMC, Strasbourg), ce qui a permis à Igor

ORLOV (IGBMC, Illkirch) d'obtenir par cryo-microscopie électronique (*single particle cryo electron microscopy*, cryo-EM) la structure du Nb23 en complexe avec le GFLV-F13. Le modèle tridimensionnel moyen a été reconstruit par ordinateur en combinant les images, ou plus précisément les projections à deux dimensions, de 6139 particules sélectionnées à partir de 1055 acquisitions et a été affiné en s'appuyant sur la structure cristallographique du GFLV disponible depuis 2011 (Schellenberger *et al*, 2011). En périphérie, où le Nb est peu ordonné, la résolution obtenue se situe entre 3,5 et 5 Å, mais d'autres régions, plus contraintes et donc moins soumises à des variations de conformation comme le site de contact du Nb avec la particule, ont pu être résolues localement à moins de 3 Å permettant de discerner précisément les chaînes latérales des résidus en interaction. La résolution globale du complexe est estimée à 2,8 Å par corrélation des enveloppes de Fourier (*Fourier shell correlation*, FSC) avec le critère de référence standard $FSC_{0.143}$. Les dernières avancées des techniques et des équipements, comme le microscope Titan Krios utilisé dans cette étude, permettent actuellement à la cryo-EM d'atteindre de telles résolutions réservées jusqu'il y a peu à la cristallographie et à la résonance magnétique nucléaire (RMN). De plus, dans le cas de molécules comme des capsides de virus, l'information apportée par leur symétrie intrinsèque facilite considérablement l'amélioration de la précision de leur reconstruction 3D. Pourtant, sur 586 structures de virus déposées à ce jour dans la banque européenne de données de cryo-microscopie électronique (*Electron Microscopy Data Bank*, EMDB) moins de 10 structures icosaédriques sont publiées à une résolution inférieure à 3,5 Å. Quant aux complexes de Nb avec un virus, même si les structures d'un Nb avec un fragment de la protéine de capsid du norovirus (Koromyslova & Hansman, 2014) ou avec la protéine accessoire Nef du HIV-1 (Lülf *et al*, 2014) ont été obtenues par cristallographie à une résolution de 1,7 Å et 2,1 Å, respectivement, la plus haute résolution en cryo-EM a été récemment obtenue à seulement 4,8 Å avec des Nb neutralisant le poliovirus (Schotte *et al*, 2014). L'approche structurale apporte donc, outre la confirmation et l'illustration des résultats biologiques obtenus, une véritable valeur ajoutée à ces travaux et renforce d'autant plus leur dimension novatrice.

2.1.2 Article en préparation

Note : Le manuscrit inséré ci-après correspond à une version postérieure à la soutenance de thèse. Il contient des éléments structuraux nouveaux qui peuvent être source d'incohérences ou de redondances avec le reste du mémoire de thèse dont le texte n'a pas été modifié.

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 Marmonier², Kamal Hleibieh¹, Corinne Schmitt-Keichinger¹, Emmanuelle Vigne², Sophie Gersch², Véronique Komar², Lorène Belval², François Berthold¹, Baptiste Monsion¹, Patrick Bron⁵, Olivier Lemaire², Bernard Lorber⁶, Jean-Yves Sgro⁷, Carlos Gutiérrez⁸, Serge Muyldermans⁹, Gérard Demangeat², Bruno P. Klaholz³ and Christophe Ritzenthaler¹

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, 34090 Montpellier, 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.

* These authors contributed equally to this work

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

Abstract

Single-domain antigen-binding fragments of camelid-derived heavy chain-only antibodies, also known as Nanobodies (Nbs), have triggered considerable interest as therapeutics against human diseases but little yet against plant pathogens. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is transmitted by a dagger nematode and causes economic damage in vineyards worldwide. Here we show that a GFLV-specific Nb, when constitutively expressed in a systemic host plant, confers resistance to GFLV upon mechanical inoculation or nematode transmission. Resistance occurs at an early step of the virus life cycle, prior to cell-to-cell movement, and is effective against a broad range of GFLV isolates. The 2.8 Å resolution structure of the GFLV-Nb complex obtained by cryo electron microscopy allowed precise mapping of the conformational epitope at the virion surface and provides insights into the mechanisms of resistance and transmission. Our findings pave the way for the generation of novel Nb-based antiviral strategies in plants.

Since their discovery¹, 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 pathogens³⁻⁵ including viruses⁶⁻⁸, but their use against phytopathogens remains limited⁹. 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^{10,11}. 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 that is analogous to the canyon of picornaviruses, implicated in receptor binding¹². 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 viruses¹³, 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 β sandwiches¹⁴. 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 *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV; Fig. 1b), a close relative of GFLV¹⁵ (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 37 ± 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 infection¹⁶ (Extended Data Fig. 3). EGFP-expressing plant lines inoculated with GFLV displayed symptoms and tested GFLV-positive in ELISA. In contrast, infection rates among 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^{17,18}.

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*¹⁹ (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 (3.2%, 158 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 TagRFP²⁰. Whereas numerous infection foci (64.3 +/- 5.9 foci) were counted on inoculated leaves from three independent EG11-3 plants (Fig. 1d and f), no evidence of infection in equivalent leaves from 23EG16-9 plants was detected (Fig. 1e and f). Altogether, our results show that Nb23 displays potent antiviral activity against GFLV *in planta* and virus neutralization occurs early during infection before cell-to-cell movement.

To gain molecular insights into the virus-Nb interface mediating resistance, the structure of the GFLV-Nb23 complex was determined by high-resolution single particle cryo-EM (Fig. 2). Using high-sensitivity detector technologies and angular reconstitution method^{21,22}, the structure (Figs. 2a and b) was refined to an average resolution of 2.8 Å, as estimated from Fourier shell correlation^{23,24} (Extended Data Fig. 9; see Methods). Local resolution estimation shows that, while Nb23 is moderately ordered at the periphery (3.5-5 Å resolution towards the C-terminus), it is very well defined in the region oriented towards the capsid (including the antigen-binding loops) where the side-chains are visible, like for the virus capsid (Fig. 2c). The cryo-EM map was used to build and refine an atomic model with proper model geometry and statistics involving iterative manual model building (notably of the antigen-binding loops) and structure refinement (see methods). The structure reveals that Nb23 binds at the surface of GFLV in the vicinity of the 5-fold axis (Figs. 2a and b). The outer isocontour surface of the GFLV-Nb23 reconstruction (Figs. 2a and b and Extended Data Fig. 9) shows that the Nb23 molecules are positioned far enough from each other to allow 60 of them to attach and reach full 1:1 stoichiometric binding without bridging neighboring CPs. The interaction region essentially involves residues of the complementarity determining regions (CDR) 3 and CDR2 of Nb23, as well as the two neighboring CP domains A and B (2 out of the 3 jellyroll β-sandwiches of the CP) that jointly form a composite binding site with two core interacting regions denoted 1 and 2 (Fig. 2d), adding up to a large total interaction surface of ~1100 Å² indicative of a stable complex. Within these regions, a high level of specific interactions between the capsid and the antibody is provided through a series of hydrogen bonds. Region 1 (Fig. 2e) comprises loop region 212-216 (βC'') 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 β-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 β -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 pocket¹⁴ (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^{14,25}. 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 μ g 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 Tyr₂₁₆His and Phe₅₀₂Leu 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 clone¹⁶. 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-Tyr₂₁₆His 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-Tyr₂₁₆His, Phe₅₀₂Leu 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 viruses²⁶. Since GFLV moves from cell-to-cell as entire virions in a tubule-guided manner²⁰, 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 with the canyon of picornaviruses to which host cell membrane receptors bind¹² suggesting a structural conservation across *Picornavirales* driving vector specificity and receptor binding. Last but not least, our findings demonstrate the strong potential of Nbs for the 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 Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* **8**, 1013-1026 (2013).
- 5 Lo, A. W. *et al.* The molecular mechanism of Shiga toxin Stx2e neutralization by a single-domain antibody targeting the cell receptor-binding domain. *J. Biol. Chem.* **289**, 25374-25381 (2014).
- 6 Lülfi, 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).
- 7 Vanlandschoot, P. *et al.* Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral res.* **92**, 389-407 (2011).
- 8 Desmyter, A. *et al.* Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, E1371-E1379 (2013).
- 9 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).
- 10 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).
- 11 Scholthof, K.-B. G. *et al.* Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 938-954, doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x (2011).

- 12 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).
- 13 Martelli, G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* **96**, 1-136, doi: 10.4454/JPP.V96I1SUP (2014).
- 14 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).
- 15 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, doi:10.1016/j.jsb.2013.01.007 (2013).
- 16 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).
- 17 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).
- 18 Saerens, D., Conrath, K., Govaert, J. & Muyldermans, S. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J. Mol. Biol.* **377**, 478-488 (2008).
- 19 Andret-Link, P. & Fuchs, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. *J. Plant Pathol.*, 153-165 (2005).
- 20 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).
- 21 van Heel, M. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* **21**, 111-123 (1987).
- 22 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).
- 23 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).
- 24 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).
- 25 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).
- 26 Schotte, L. *et al.* Mechanism of action and capsid-stabilizing properties of VHHs with an in vitro antipoliioviral activity. *J. Virol.* **88**, 4403-4413 (2014).
- 27 Xiao, C. & Rossmann, M. G. Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections. *J. Struct. Biol.* **158**, 182-187 (2007).

Acknowledgments

We thank Marc Fuchs, Robert Drillien and Félix Rey 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 Interprofessionnels 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).

Contributions

C.H., I.O., A.M., 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., B.P.K. and C.R. performed the experiments; C.H., I.O., E.V., B.L., G.D., B.P.K. and C.R. 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.

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	20	20	100%	20	0	0%	20	1	5%	5
	sap	24	24	100%	24	0	0%	24	0	0%	6
	RNA 360 ng	10	10	100%	10	0	0%	10	1	10%	7
GFLV-F13	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	0	0%	6
	nematodes	13	12	92%	20	0	0%	20	0	0%	8
GFLV-B844	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	0	0%	6
GFLV-TD	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	1	8%	6
GFLV-CO2	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	1	8%	6
GFLV-BUCharT60	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	0	0%	6
GFLV-BE 4.11	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	1	8%	6
GFLV-BE 5.19	sap	12	12	100%	12	0	0%	12	0	0%	6
Total GFLV		151	150	99.3%	158	0	0.0%	158	5	3.2%	
ArMV-S	300 ng	10	10	100%	10	10	100%	10	10	100%	5
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.

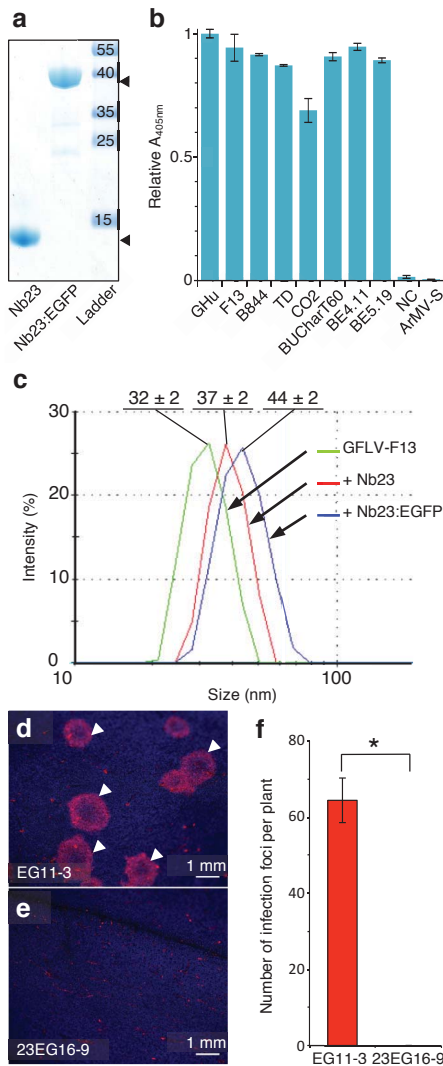


Fig. 1 | Nb23 recognizes GFLV and virus neutralization occurs at the cellular level. a, Coomassie-blue stained denaturing gel loaded with purified Nb23 and Nb23:EGFP (arrowheads). **b,** Nb23-based DAS-ELISA results of *Chenopodium quinoa* infected with eight different GFLV isolates and ArMV-S. NC, healthy plant. Values are means \pm SD ($n = 2$, experimental duplicates). **c,** Dynamic light scattering (DLS) analyses of GFLV-F13 alone (green curve) and GFLV complexed to Nb23 (red curve) or to Nb23:EGFP (blue curve). All particles were monodisperse with diameters of 32 ± 2 nm (mean \pm SD, $n = 3$) for GFLV-F13, 37 ± 2 nm (mean \pm SD, $n = 3$) for GFLV-F13 saturated with Nb23, and 44 ± 2 nm (mean \pm SD, $n = 3$) for GFLV-F13 saturated with Nb23:EGFP. Fluorescence images from EGFP- **d**, and Nb23:EGFP- **e**, expressing *N. benthamiana* leaves inoculated with a recombinant GFLV encoding TagRFP, at 6 dpi. Arrowheads point at typical GFLV infection foci. Blue channel corresponds to chlorophyll and faint red background in **d**, and **e**, to autofluorescence generated by physical damage upon mechanical inoculation. **f**, Average number of infection foci calculated from three different leaves and three independent plants from lines EG11-3 and 23EG16-9. Values are means \pm SD ($n = 9$). The asterisk indicates statistically significant differences (Student *t*-test, $P = 0.002$).

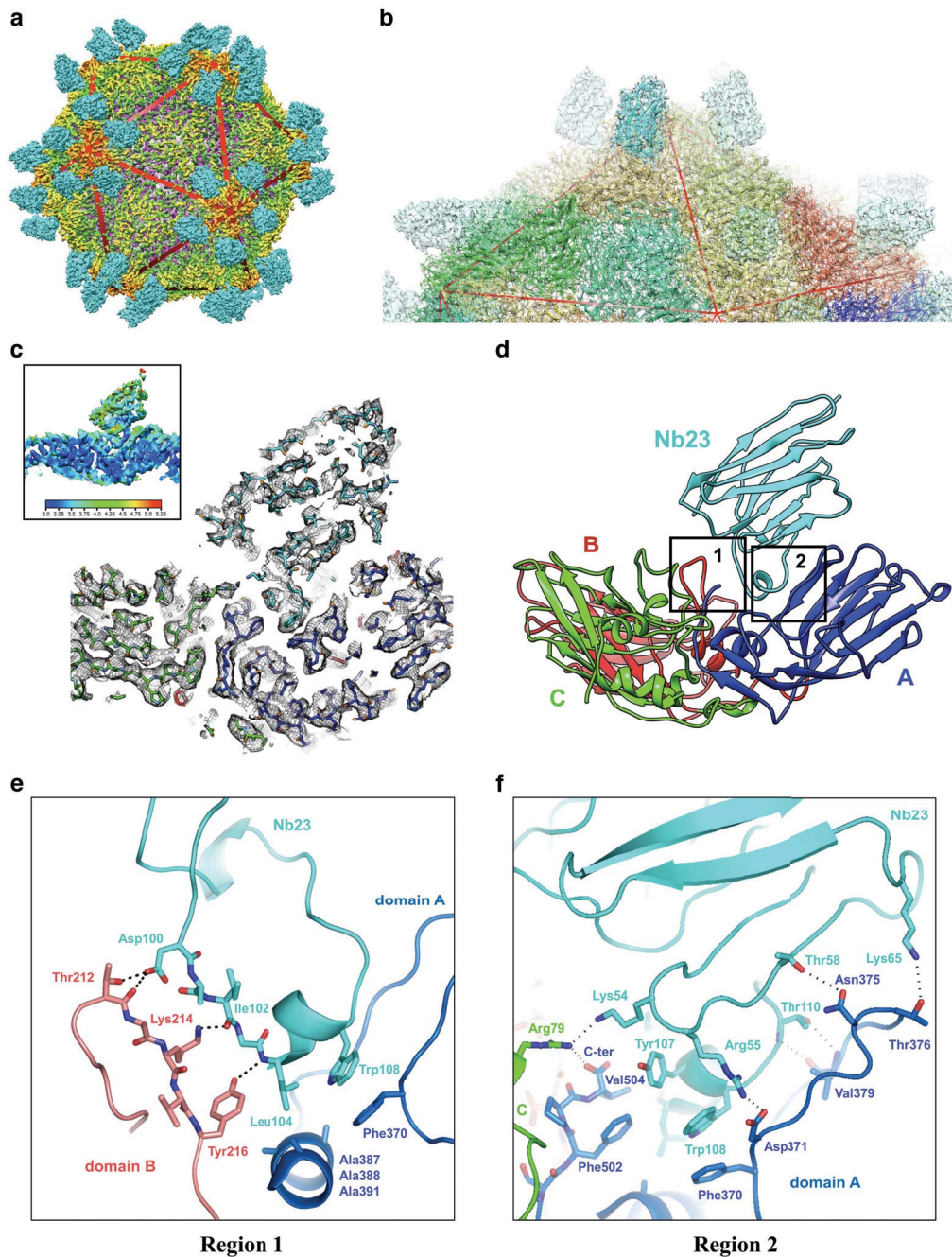


Fig. 2 | The 2.8 Å resolution cryo-EM structure of the GFLV-Nb23 complex. a, Global 3D reconstruction of the GFLV-Nb23 complex with Nb23 shown in cyan on the GFLV outer surface. Icosahedral edges are indicated by red triangles. **b,** Detailed view of the cryo-EM map with the fitted atomic model showing 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).

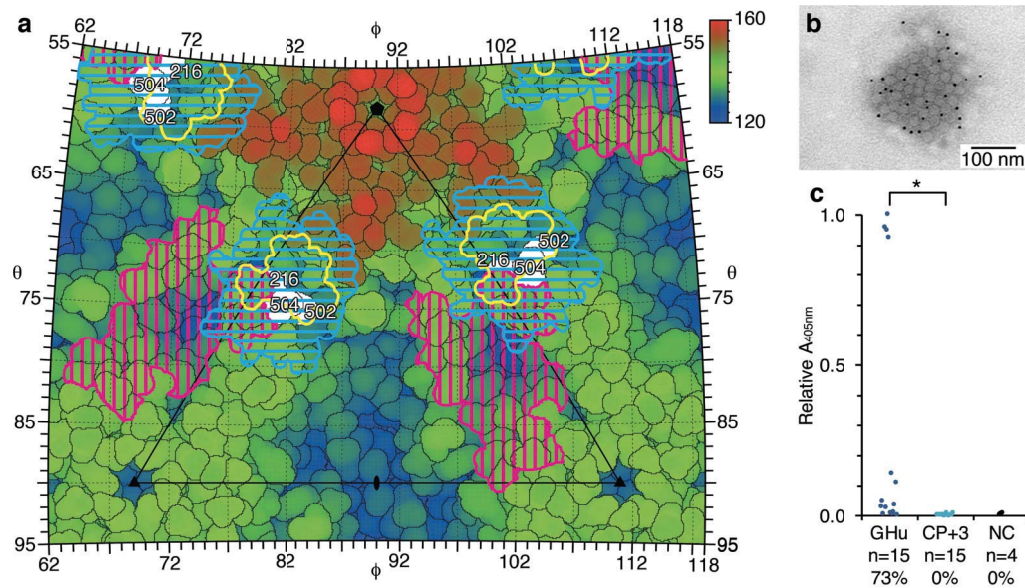


Fig. 3 | Overcoming Nb23-mediated resistance can occur at the expense of transmission. a, Roadmap²⁷ showing the projected surfaces of the GFLV for one (triangular) icosahedral asymmetric unit in which the polar angles θ and ϕ represent latitude and longitude, respectively. The Nb23 footprints and projected 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. The coloring is according to the radial distance of the surface from the center of the particle (from blue, 120 Å, to red, 160 Å). **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 ($n = 15$, except for healthy negative control, NC, $n = 4$) and represent the mean relative A_{405nm} of one to five experimental duplicates normalized against maximum assay value. The asterisk indicates statistically significant differences (Student t -test, $P < 0.001$).

METHODS

Virus isolates. GFLV and ArMV isolates used in this study were GFLV-GHu²⁸, -F13²⁹⁻³¹, -B844³², -TD¹⁴, -CO2³³, -BuCharT60, -BE 4.11, -BE 5.19 and ArMV-S³⁴.

Immunization, Nanobodies library construction and screening. GFLV-specific single domain antibodies or Nanobodies (Nbs) were generated according to Ghassabeh, et al.³⁵. Briefly, a camel (*Camelus dromedarius*) was injected six times subcutaneously at weekly intervals with 100 µg of purified GFLV-F13 according to standard immunization protocols. After immunization, total RNA was extracted from isolated peripheral blood lymphocytes and mRNAs were reverse transcribed to cDNA. The regions encoding variable fragments of heavy chain-only antibodies were then amplified with two subsequent PCR, cloned into the pHEN4 phagemid vector³⁶ and transformed into *E. coli* TG1 cells. The resulting Nbs library was screened by phage display for GFLV-specific binders in three consecutive biopanning rounds against 10 µg of purified GFLV-F13 each. Sequences of GFLV-specific Nbs were obtained following the isolation of individual clones from the enriched library by a phage-ELISA approach performed against 100 ng of purified GFLV-F13.

Expression and purification of Nbs from *E. coli*. GFLV-specific Nbs coding sequences were sub-cloned into the pHEN6³⁷ expression vector as a BstEII/PstI fragment adding a N-terminal PelB signal peptide sequence for periplasmic targeting and a C-terminal 6-His-tag for purification. Production of 6-His-tagged Nbs constructs was performed by expression in freshly transformed *E. coli* WK6 cells grown in Terrific Broth (TB) medium and induced overnight with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 28°C³⁸. An additional C-terminal Strep-tag II (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) was added for Nbs use in ELISA. To do so, Nbs coding sequences were amplified by PCR using primer pair #152/#197 (Extended Data Table 1) and amplicons were introduced by Gateway cloning into the pDONR/Zeo vector (Invitrogen) which was further recombined into the p0GWA expression vector³⁹. Large-scale production of Strep II tagged Nbs constructs was performed by expression in freshly transformed *E. coli* BL21 (DE3) cells grown overnight at 23°C in auto-inducing ZYP 50502 medium⁴⁰.

Nbs were extracted from periplasm by osmotic shock⁴¹ and purified at 4°C by immobilized metal ion chromatography (IMAC) on a 1 ml Protino Ni-NTA column (Macherey-Nagel) using 500 mM imidazole in running buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0) for elution, followed by size exclusion chromatography (SEC) on a Hiload 16/60 Superdex75 prep grade column (GE Healthcare Life Science) in 1X phosphate buffer saline (PBS)^{37,38}. Purity of eluted proteins was assessed by Coomassie blue staining of denatured Nbs that migrate as single bands of ca. 15 kDa in Tris-tricine polyacrylamide gel. Purification yields were estimated from absorbance at 280 nm based on extinction coefficients computed from Nbs amino acid composition.

DAS-ELISA assessment of Nb23 reactivity against GFLV strains. Plants at the 4- to 6-leaf

stage were mechanically inoculated with crude saps from *Chenopodium quinoa* infected with various GFLV isolates. Apical non-inoculated leaves were ground at 14 days post inoculation (dpi) in extraction buffer (35 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄, pH 7.0) in a 1:5 w/v ratio. Virus detection was performed on clarified extracts by DAS-ELISA using anti-GFLV (120412, Bioreba) or anti-ArMV polyclonals (120312, Bioreba) diluted 1,000-fold in coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) as capture antibody and the Strep II tagged Nb23 at 1 µg/ml in conjugate buffer (10 mM PBS, 0.1% w/v bovine serum albumin (BSA), 0.05% v/v Tween 20, pH 7.4) as detection antibody. For development, streptavidin-alkaline phosphatase (Jackson Immunoresearch) at 50 ng/ml in conjugate buffer was used in conjunction with para-nitrophenyl phosphate (Interchim) at 1 mg/ml in substrate buffer (1 M diethanolamine, pH 9.8). Negative control consisted of non-inoculated healthy plants. Absorbance at 405 nm (A_{405nm}) was recorded after one hour of substrate hydrolysis and samples with mean A_{405nm} values exceeding by a factor of 2.4 those of negative controls were considered positive. Results are presented as mean absorbance of experimental duplicates ± standard error normalized against maximum assay value.

***Nicotiana benthamiana* transformation and production.** Nb23 was cloned in frame to the N-terminus of EGFP with a Gly3-Ser-Gly3 linker sequence into the pEAQ HT DEST3 plant expression vector⁴². EGFP was first introduced into the pHEN6-Nb23 vector as an EcoRI/BstEII fragment following a PCR amplification with primer pair #429/#430 (Extended Data Table 1). The Nb23:EGFP gene was then re-amplified by PCR using primer pair #153/#150 (Extended Data Table 1) and introduced by Gateway cloning into the pDONR/Zeo vector (Invitrogen) which was further recombined into the pEAQ HT DEST3 vector. A control consisting of pEAQ HT DEST3-EGFP was included.

The resulting vectors were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 cells⁴³ and used at A_{595nm} = 0.1 for agro-transformation of *N. benthamiana* leaves⁴⁴. After 3 days, expression of fluorescence was checked and sterilized infiltrated leaf segments placed in a growth chamber (16 h light/8 h dark, 25 °C) onto shoot induction medium (Murashige and Skoog (MS) medium (M0238, Duchefa), 10 mM NH₄NO₃, 1x MS vitamin solution (M2909, Sigma), 3% w/v sucrose, 0.05 µg/ml 1-naphthalene acetic acid, 2 µg/ml 6-benzyl-aminopurine, 0.8% w/v agar, 150 µg/ml kanamycin, 500 µg/ml carbenicillin, pH 5.8). Calli were subcultured every week onto fresh medium and shoots excised 3 to 4 weeks later were transferred onto rooting medium (1/2 MS medium, 1.5% w/v sucrose, 0.5X MS vitamin solution, 0.8% w/v agar, 150 µg/ml kanamycin, 500 µg/ml carbenicillin, pH 5.8) until plantlets could be acclimatized and established in soil. Regenerated T0 plants were self pollinated through T2 generation.

Nb23:EGFP purification. For Nb23:EGFP production, the whole Nb23:EGFP:6-His coding sequence was cloned into the pET-22b(+) expression vector (Novagen) as a NdeI/XhoI fragment subsequent to a PCR amplification with primer pair #397/#399 (Extended Data Table 1) using

pEAQ HT DEST3-Nb23:EGFP as template. Expression was performed in freshly transformed *E. coli* SHuffle T7 Express cells (New England Biolabs) grown in TB medium and induced overnight with 0.1 mM IPTG at 20 °C⁴¹. Pelleted cells resuspended in PBS-NaCl buffer (10 mM PBS, 300 mM NaCl, pH 7.4) were lysed by sonication (80% amplitude for 2 min with 13 mm diameter probe, Vibra-Cell VCX 500 (Sonics)) and purification of cytoplasmic extract was carried out as indicated above. The purity of the eluted protein was assessed by Coomassie blue staining of denatured Nb23:EGFP that migrates as a band of ca. 43 kDa in Tris-tricine polyacrylamide gel upon electrophoresis.

Quantification of Nb23:EGFP expressed in *N. benthamiana* plants. Amounts of recombinant proteins expressed in transgenic plants were estimated by fluorimetry and immunoblotting. To do so, the three youngest apical leaves of 6- to 7-week-old *N. benthamiana* plants were homogenized in extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 100 mM ascorbic acid, 2.5% w/v polyvinylpyrrolidone, complete protease inhibitor cocktail (Roche), pH 7.0) in a 1:2 w/v ratio. Cell debris were removed by centrifugation at 20,000 x g for 20 min at 4 °C and total soluble protein concentrations were determined using the BioRad protein assay following manufacturer's instructions with serial dilutions of BSA in extraction buffer as standard.

Fluorescence intensity was recorded in a FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech) equipped with 485/12 nm excitation and 520/25 nm emission filters, on 100 µl of soluble extracts in a white flat bottom polystyrene plate (Greiner Bio One). Wild type (WT) *N. benthamiana* extracts were used as blank and known amounts of purified Nb23:EGFP diluted in extracts from WT plants were used for fluorescent titration.

For immunoblotting, total soluble proteins were acetone-precipitated, heat-denatured in protein denaturing buffer, separated by Tris-glycine SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using the Trans Blot Turbo transfer system (BioRad). After incubation in blocking buffer (10 mM PBS, 0.1% v/v Tween-20, 5% w/v skim milk), proteins were sequentially probed with rabbit anti-GFP IgGs (G-1544, Sigma) at 0.1 µg/ml in blocking buffer and goat anti-rabbit IgGs conjugated to horseradish peroxidase (G-21234, Life Technologies) at 0.1 µg/ml in blocking buffer. Immunolabeled proteins were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) using the Lumi-imaging system (Vilber Lourmat).

Dynamic Light Scattering (DLS). Viral particles were purified as described previously¹⁴. Mean particle diameters and polydispersity of GFLV-F13 alone or complexed to Nb23 or to Nb23:EGFP was estimated by DLS⁴⁵ using a Zetasizer NanoZS (Malvern) and Nanostar (Wyatt). Five successive measurements were performed using three independent virus and protein preparations with virus at 0.1 mg/ml in Tris buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.3), Nb23 at 0.1 mg/ml and Nb23:EGFP at 0.9 mg/ml. Scattered intensities were recorded at 20 °C and data processed with DTS software (version 6.01) or DYNAMICS (version 7.1.8.93), respectively.

Reverse Transcriptase-qPCR (RT-qPCR) analyses. The accumulation of GFLV RNA1 and EGFP/Nb23:EGFP transcripts was quantified by RT-qPCR relatively to the expression of cyclin dependent kinase homolog (GI:849067, *Nicotiana tabacum*), elongation factor 1 alpha (GI:37783254) and actin (GI:380505031) genes from *N. benthamiana* used as internal controls due to their stability assessed by GeneNorm⁴⁶ and NormFinder⁴⁷ algorithms. Total RNA was isolated at 21 dpi from approximately 17 mg of non-inoculated apical leaves ground at a 1:30 w/v ratio in TLES-buffer (100 mM Tris, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 0.1% w/v SDS, pH 8.0) followed by a water-saturated phenol and a phenol chloroform extraction before precipitation with 2 M LiCl. cDNA was generated according to manufacturer's instructions from 1 µg of DNaseI treated total RNA using 2.5 µM Oligo(dT)18 primer (Fermentas) and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR was performed in triplicates using 0.5 µl of reverse transcription reaction and 2.5 µM gene specific primers (Extended Data Table 2) in a total volume of 10 µl LightCycler 480 SYBR Green Master I mix (Roche) on a LightCycler 480 system (Roche) with cycling conditions of 5 min denaturation at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 15 s. Relative gene expression levels were calculated by means of the linear regression of efficiency method using LinRegPCRsoftware (version 2013.0)⁴⁸.

Synthetic GFLV-CP+3 construct. GFLV-CP+3 point mutation was introduced into full length GFLV-GHu RNA2 cDNA infectious clone (pG2)¹⁶ as a BglII/SalI fragment following an overlap extension PCR amplification using #G38/#388 and #387/#387 primer pairs (Extended Data Table 1) and pG2 as template. GFLV-GHu RNA1, -GHu RNA2 and -CP+3 RNA2 capped transcripts were synthesized from corresponding NotI or SalI linearized cDNAs clones by *in vitro* transcription with mMMESSAGE mMACHINE T7 kit (Ambion) according to supplier's instructions. For infections, combination of appropriate RNA1 and RNA2 transcripts was used to mechanically inoculate *N. benthamiana* plants at the 4- to 6-leaf stage.

Inoculations. Plants were inoculated either mechanically or naturally via nematodes. Mechanical inoculations were performed with either purified virus at 300 ng or 3 µg per inoculum, sap of infected *C. quinoa* plants or purified viral RNA at 360 ng per inoculum. Viral RNA was isolated from purified virus using RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) after phenol/chloroform extraction. Nematode inoculation was performed by growing plants for 6 weeks on soil (3:1:1 v/v ratio of sand, loess and clay pebbles) containing ca. 300 viruliferous *Xiphinema index* per plant. DAS-ELISAs were performed at 16 weeks post contact with nematodes on apical non-inoculated leaves using in-house anti-GFLV antiserum or anti-GFLV detection kit (120462, Bioreba) according to standard protocols and manufacturer's instructions.

Transmission assays. Transmission assays by nematodes were performed using a 2-step transmission procedure according to Marmonier, et al.⁴⁹. During a 6-week acquisition access period, ca. 300 aviruliferous *X. index* per plant were left in contact with roots of systemic infected

N. benthamiana grown in a 3:1:1 v/v ratio of sand, loess and clay pebbles soil. Source plants were then substituted with healthy *N. benthamiana* for a 8- to 10-week inoculation access period at the end of which virus transmission was tested on roots of bait plants by DAS-ELISA. GFLV-GHu was used as positive and healthy source plants as negative controls, respectively.

Fluorescence microscopy. For cellular-level scale observations, water-mounted leaf disks of 6- to 7-week-old *N. benthamiana* plants were imaged with a LSM 780 laser scanning confocal microscope (Zeiss) attached to an observer Z1 microscope (Zeiss) equipped with a 20x/0.8 Plan-Apochromat objective and using excitation and emission wavelength filters set to 488 nm and 499-521 nm.

For macroscopic observations, attached leaves from plants were imaged with an AxioZoom V16 microscope (Zeiss) using excitation and emission wavelength filters of 538-562 nm and 570-640 nm for red channel and of 625-655 nm and 665-715 nm for chlorophyll imaging. Images were processed using Zen 2011 imaging software (Zeiss) and Photoshop CS5 (Adobe).

Immunosorbent electron microscopy (ISEM). GFLV-CP+3 infected leaves were ground in phosphate buffer (35 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄), centrifuged at 3,000 x g for 5 min and clarified samples incubated for 2 h on carbon-coated formvar 300 mesh nickel grids (Electron Microscopy Science) coated with anti-GFLV polyclonal antibodies (120412, Bioreba) at 1:200 dilution. After blocking with 2% w/v BSA, 10% v/v normal goat serum, 0.05% Triton-X100 in 22.5 mM HEPES pH 8 for 30 min, grids were incubated with monoclonal anti-GFLV antibodies (120422, Bioreba) at 1:150 dilution for 30 min and immunogold labeling performed using anti-mouse antibodies conjugated to 10 nm colloidal gold particles at 1:50 dilution for 30 min (EM.GAMA10, British Biocell International). Experiment was performed at room temperature and washes done with phosphate buffer between all steps. Observations were realized after negative staining with 1% ammonium molybdate using a Philips EM208 transmission electron microscope.

Structure determination. Nb23 was mixed with purified GFLV-F13 at a 70:1 or 100:1 molecular ratio so as to exceed the theoretical maximum number of 60 possible binding Nbs per capsid. Samples of the freshly prepared GFLV-Nb23 complex (2.5 µl of a 0.5 mg/ml solution) were applied to 300 mesh holey carbon Quantifoil R1.2/1.3 grids (Quantifoil Micro Tools), blotted with filter paper from both sides in the temperature- and humidity-controlled Vitrobot apparatus (FEI) (T = 20 °C, humidity 99%, blot force 4, blot time 0.5 s) and vitrified in liquid ethane pre-cooled by liquid nitrogen. Images were collected on the in-house spherical aberration (Cs) corrected Titan Krios S-FEG instrument (FEI) operating at 300 kV acceleration voltage and at an actual underfocus of $\Delta Dz = -0.6$ to -6.0 µm using the second-generation back-thinned direct electron detector CMOS (Falcon II) 4,096 × 4,096 camera and automated data collection with EPU software (FEI) using seven frames over one second exposure (dose rate of ~ 40 e⁻ Å⁻²s⁻¹). The calibrated magnification (based on the fit of the GFLV crystal structure into the cryo-EM map) is 127,272× resulting in

0.533 Å pixel size at the specimen level (virtually no difference with the nominal pixel size of 0.533 Å). Before semi-automatic particle picking using IMAGIC²², stack alignment was performed using the whole image motion correction method⁵⁰, and correction of the contrast transfer function was done by phase flipping using IMAGIC. After centering by alignment against the total sum reference image, 2D classification in IMAGIC was used to remove bad or empty particles, leaving 6,139 out of 9,502 particles (selected from 1,055 images). For the first steps of image processing, the images were coarsened by 4, and further refinement was achieved with two-times coarsened data. The structure was determined via common lines angle assignment and refined with the anchor set angular reconstitution procedure as implemented in IMAGIC, using final search angles of 0.05°. The resolution was estimated according to Fourier shell correlation (FSC), indicating an average resolution of 2.8 Å according to the ‘gold-standard’ 0.143 and half bit resolution criteria^{23,24}. Local resolution values were calculated with ResMap. Map interpretation was done using Chimera⁵¹ and COOT⁵² starting from the available atomic model of the GFLV crystal structure (PDB IDs 4V5T/2Y7T¹⁴) and of a homology model of Nb23 that we derived from the cAb-Lys3 VHH antibody domain using the Swiss-Model Server (swissmodel.expasy.org, starting model: PDB ID 1XFP⁵³, 68% sequence identity with Nb23). Initial model building was done by a rigid body fitting, followed by extensive manual model building in Coot and real space refinement of the atomic model against the experimental map using Phenix⁵⁴. The final atomic model comprises 295,800 atoms (60 x 4,930 atoms excluding hydrogens across the 504 and 137 amino acids for each monomer of the CP and Nb23, respectively). Protein residues of the final atomic model show well-refined geometrical parameters (most favored regions 88.7%, additionally allowed regions 11%, and 0.4% of outliers in Ramachandran plots, r.m.s. bond deviations of 0.008 Å and angle deviations of 1.3°. Solvent accessible surface was calculated with the program GetArea (probe radius 1.4 Å⁵⁵). Figures were prepared using the software Chimera⁵¹ and Pymol⁵⁶.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed by unequal variances two-tailed unpaired Student's *t*-test (*P* value = 0.002) and Shapiro-Wilk test for normality (*W* = 0.87, *P* value = 0.12). The same Student's *t*-test was performed for Fig. 3c after logarithmic transformation of data (*P* value < 0.001). Normality was assessed by Shapiro-Wilk test (*W* = 0.96, *P* value = 0.29).

Primer	5'-3' Sequence
#152	gggg acaagttt gtacaaaaagcaggtctatgaatacctattgcctacgg
#197	gggg accacttt gtacaagaaagctgggtctattttcaattgaggatgagaccagtgatggatgggtg
#429	atcttaGGTCACCgtctcctcagggcggtagcggcggtatggtgagcaagggcga
#430	tactctGAATTCtattagtgatgatgatgggtgctgtacagctcgtccat
#153	gggg acaagttt gtacaaaaagcaggtctatgcaggtgcagctgcagg
#150	gggg accacttt gtacaagaaagctgggtcctgtacagctcgtccatg
#397	tcaaatCATATGcaggtgcagctgcagg
#399	gtgaCTCGAGttagtgatggatggatg
#G38	cttgctggtcaaagtcagag
#388	<u>gtcagataccct</u> <u>g</u> gactgaaaact
#387	<u>agtttccagtc</u> <u>c</u> agggtatctgac
#386	cggcatcagacagattgtactg

Extended Data Table 1 | List of primers used for Nbs cloning and virus site directed

mutagenesis. Gateway recombination sequences are indicated in bold. Strep-tag II sequence is underlined. Linker Gly3-Ser-Gly3 sequence is in italics. BstEII, EcoRI, NdeI, XhoI, BglIII and SalI restriction sites are indicated in upper case. Open boxes point to CP+3 mutation and primers overlapping region is double-underlined.

Primer	Target	5'-3' Sequence
RNA1-fwd	GFLV 1D	cccaaaagtcatcgcaatget
RNA1-rev	GFLV 1E	ggatcaggatggaaagcac
EGFP-fwd	EGFP	tatatcatggccgacaagca
EGFP-rev	EGFP	gaactccagcaggaccatgt
CDC2-fwd	Cyclin dependent kinase	gtgtagtgtacaaggctcgtga
CDC2-rev	Cyclin dependent kinase	tagctgtgcttggtactccctc
EF1a-fwd	Elongation factor 1-alpha	gtactgtccctgttggtcgt
EF1a-rev	Elongation factor 1-alpha	gtaggtccaaaggtcacaacat
ACT-fwd	actin	aaattactgcactgctcctagc
ACT-rev	actin	caatccagacactgtatttctctc

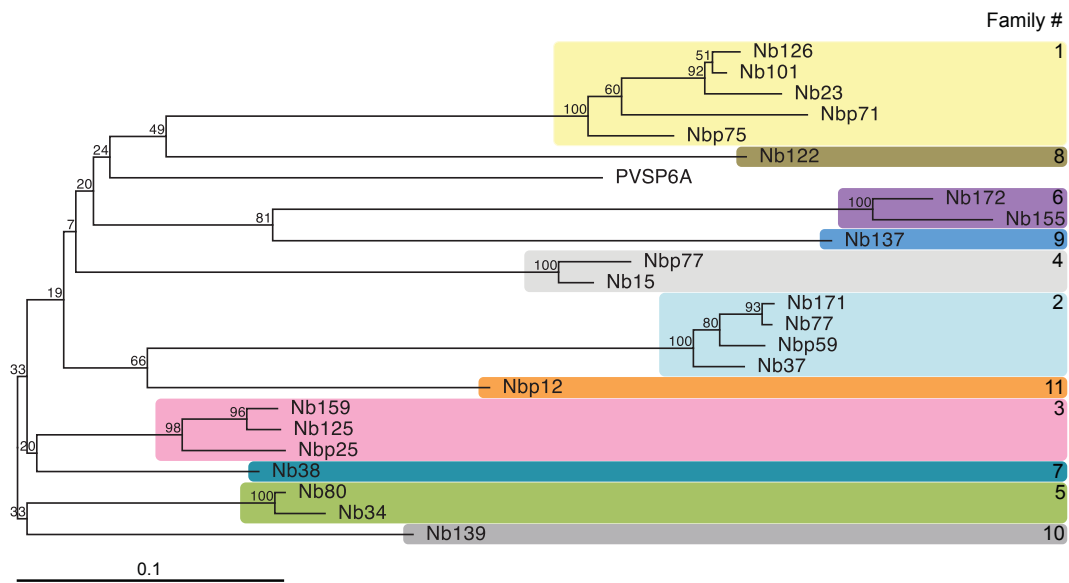
Extended Data Table 2 | List of primers used for qPCR.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

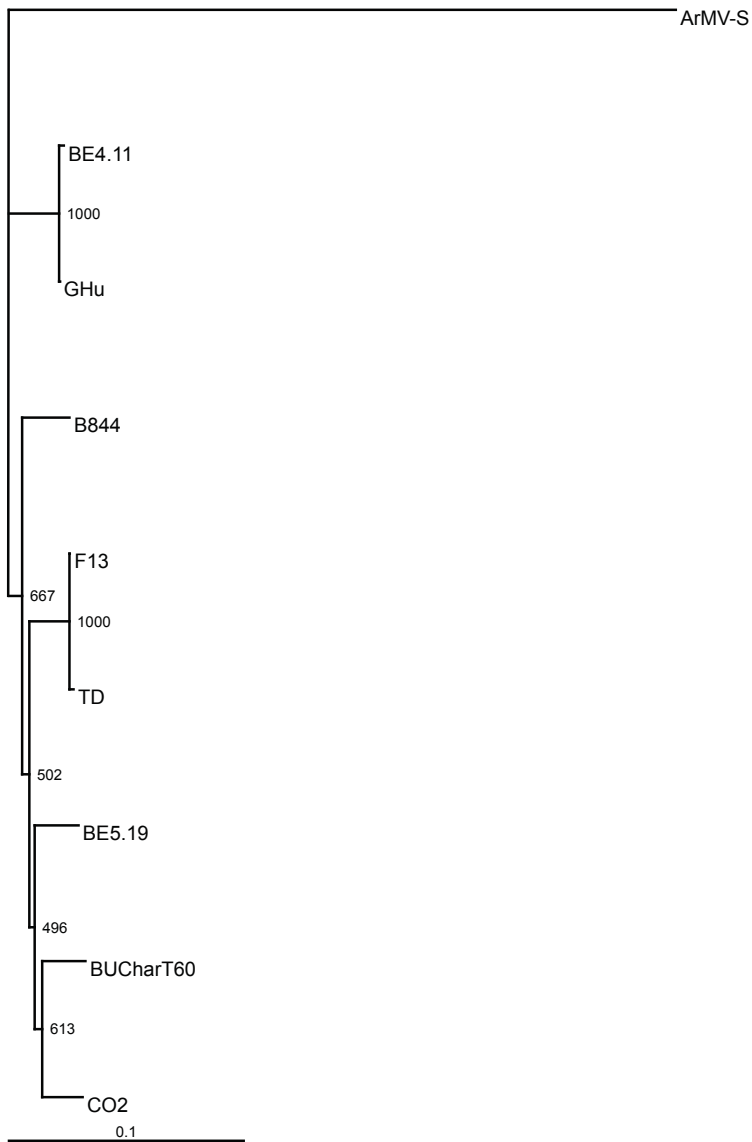
- 28 Vigne, E., Marmonier, A. & Fuchs, M. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Arch. Virol.* **153**, 1771-1776 (2008).
- 29 Pinck, L., Fuchs, M., Pinck, M., Ravelonandro, M. & Walter, B. A satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus* strain F13. *J Gen Virol* **69**, 233-239 (1988).
- 30 Ritzenthaler, C. *et al.* Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *J. Gen. Virol.* **72**, 2357-2365 (1991).
- 31 Serghini, M. *et al.* RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.* **71**, 1433-1441 (1990).
- 32 Legin, R., Bass, P. & Etienne, L. Selection of mild virus strains of fanleaf degeneration by comparative field performance of infected grapevines. *Vitis* **32**, 103-110 (1993).
- 33 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).
- 34 Loudes, A. M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M. A. & Pinck, L. The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of arabis mosaic nepovirus (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. *J Gen Virol* **76**, 899-906, doi:10.1099/0022-1317-76-4-899 (1995).
- 35 Ghassabeh, G. H., Saerens, D. & Muyldermans, S. in *Antibody engineering* 251-266 (Springer, 2010).
- 36 Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS letters* **414**, 521-526 (1997).
- 37 Conrath, K. E. *et al.* β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2807-2812 (2001).
- 38 Thys, B. *et al.* In vitro antiviral activity of single domain antibody fragments against poliovirus. *Antiviral Res.* **87**, 257-264 (2010).
- 39 Busso, D., Delagoutte-Busso, B. & Moras, D. Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal. Bioch.* **343**, 313-321, doi:10.1016/j.ab.2005.05.015 (2005).
- 40 Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207-234 (2005).
- 41 Habib, I. *et al.* V H H (nanobody) directed against human glycoporphin A: A tool for autologous red cell agglutination assays. *Anal. Bioch.* **438**, 82-89 (2013).
- 42 Sainsbury, F., Thuenemann, E. C. & Lomonosoff, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotech. J.* **7**, 682-693 (2009).
- 43 Koncz, C. & Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396 (1986).
- 44 Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A. & Hawes, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* **1**, 2019-2025 (2006).
- 45 Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. & Kern, D. Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. *Biochem Mol Biol Educ.* **40**, 372-382 (2012).
- 46 Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034 (2002).
- 47 Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR

- data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245-5250 (2004).
- 48 Ruijter, J. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e45-e45 (2009).
- 49 Marmonier, A. *et al.* The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *J. Plant Pathol.*, 275-279 (2010).
- 50 Li, X. *et al.* Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **10**, 584-590, doi:10.1038/nmeth.2472 (2013).
- 51 Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612, doi:10.1002/jcc.20084 (2004).
- 52 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501, doi:10.1107/S0907444910007493 (2010).
- 53 De Genst, E. *et al.* Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody. *J. Biol. Chem.* **279**, 53593-53601, doi:10.1074/jbc.M407843200 (2004).
- 54 Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352-367, doi:10.1107/S0907444912001308 (2012).
- 55 Fraczekiewicz, R. & Braun, W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *J. Comput. Chem.* **19**, 319-333 (1998).
- 56 DeLano, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* **40**, 82-92 (2002).
- 57 Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425 (1987).

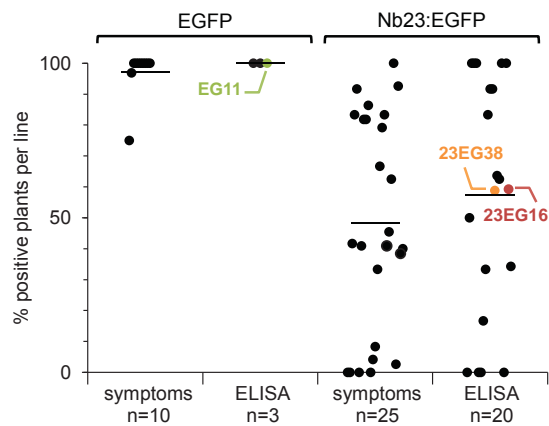
EXTENDED DATA FIGURES



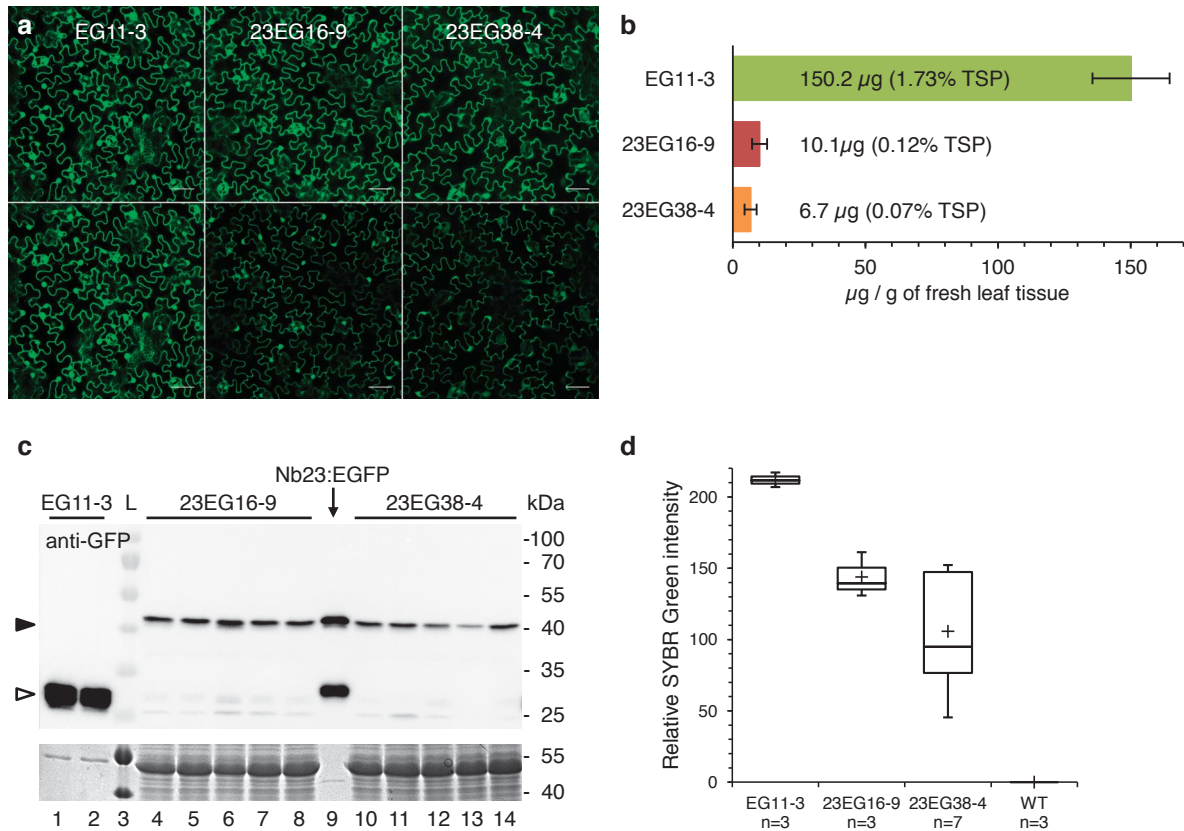
Extended Data Fig. 1 | Phylogenetic tree of Nanobodies (Nbs) directed against GFLV. The protein sequence of 23 GFLV Nbs was aligned with the ClustalO program and a tree using the Neighbor-Joining algorithm⁵⁷ was generated. Bootstrap values representing the resampling of 100 replicates are indicated above each branch node. The scale bar represents 0.1 change per amino-acid position determined by Kimura protein distance measure method. The Nbs clustered in 11 different families as highlighted by colored boxes and identified by numbers. Nb23 belongs to family #1. The amino-acid sequence of PVSP6A, a poliovirus neutralizing Nb, was used as out-group.



Extended Data Fig. 2 | Unrooted phylogenetic tree reconstructed from the amino acid sequence of the CP of the eight GFLV isolates and ArMV-S. The phylogenetic relationships were determined with Neighbor-Joining (NJ)⁵⁷ method. The robustness of the inferred evolutionary relationships was assessed by 1000 bootstrap replicates. The numbers at critical branches are significant bootstrap values obtained by the NJ method.

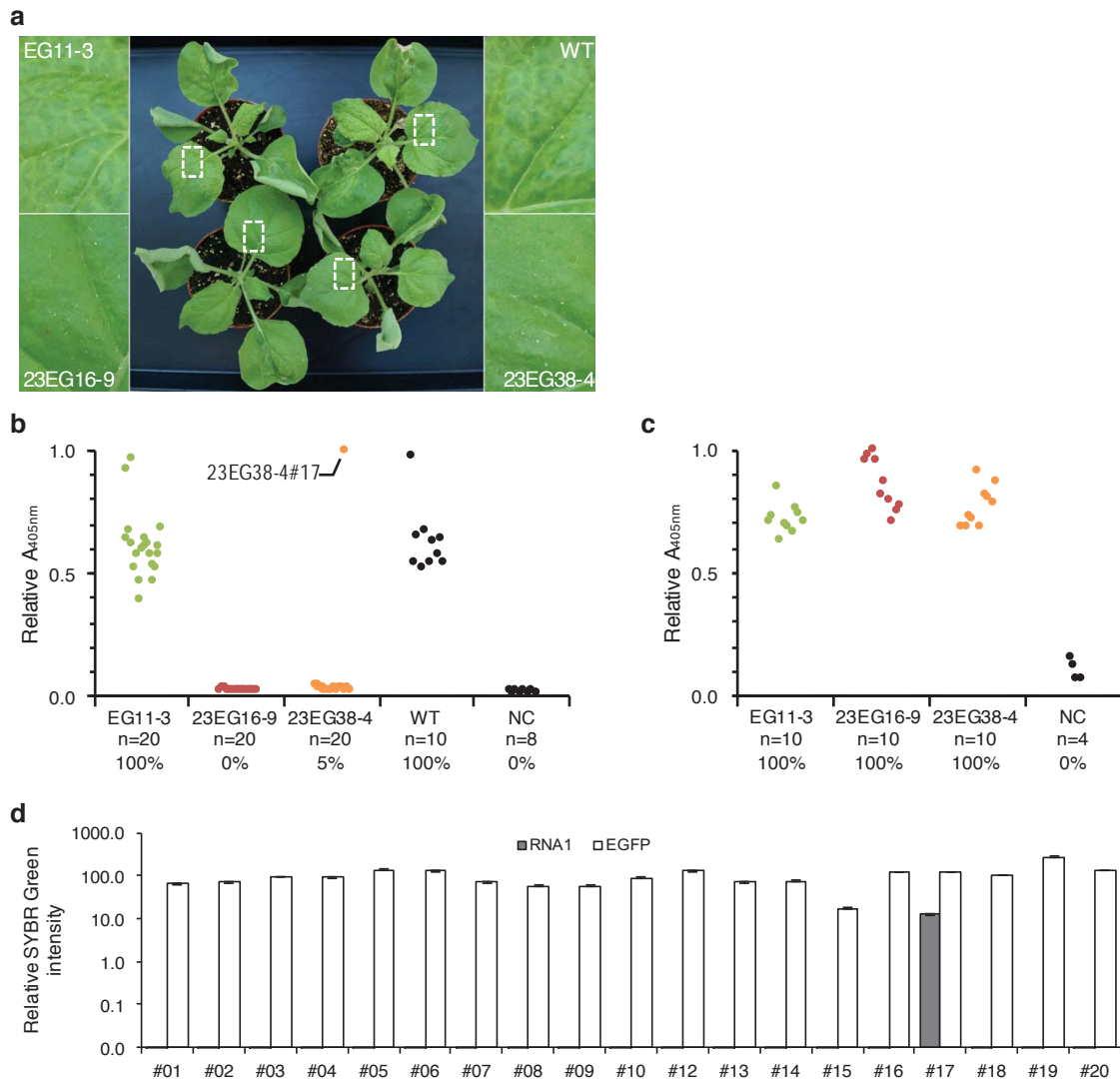


Extended Data Fig. 3 | Evaluation of T1 transgenic *N. benthamiana* lines challenged with GFLV-GHu. A total of 10 EGFP and 25 Nb23:EGFP lines, each consisting of 12 to 39 segregating plants, were mechanically inoculated with 300 ng purified GFLV-GHu and infection was monitored by symptom assessment over 28 days and by anti-GFLV DAS-ELISA at 28 dpi. Each dot on the graph corresponds to the percentage of infection per plant line. The number of lines analyzed for symptoms ($n = 10$ and $n = 25$ for EGFP and Nb23:EGFP, respectively) and by DAS-ELISA ($n = 3$ and $n = 20$ for EGFP and Nb23:EGFP, respectively) is indicated below each column (n). Horizontal bars indicate mean percentage values. Note that infection rates as determined by ELISA range from 0 to 100% for lines Nb23:EGFP compared to 100% for lines EGFP. The EGFP and Nb23:EGFP T1 lines selected to obtain T2 progeny are indicated in green, red and orange, respectively.



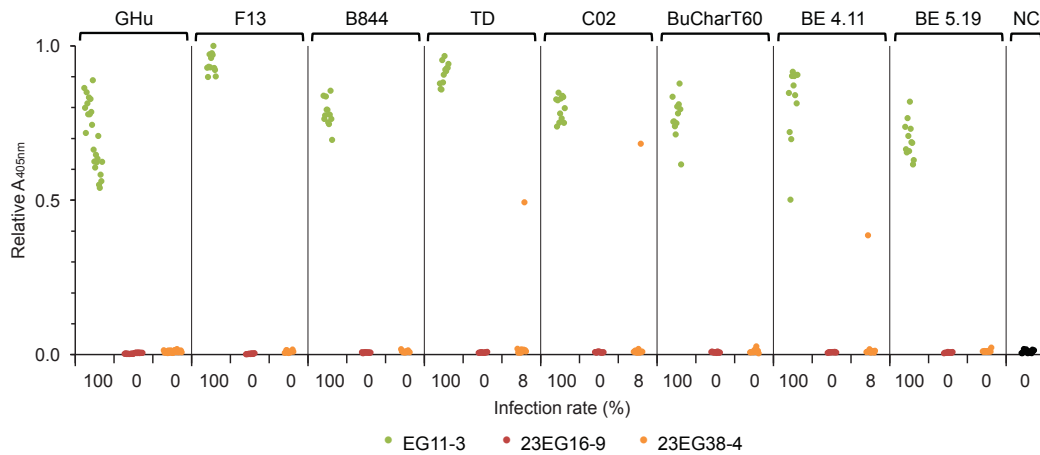
Extended Data Fig. 4 | Characterization of homozygous T2 transgenic lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4.

a, Nb23:EGFP expressed from lines 23EG16-9 (middle) and 23EG38-4 (right) is found in the cytoplasm and nucleus of leaf epidermal cells, similarly to EGFP expressed from line EG11-3 (left). Top row: equal fluorescence intensity. Bottom row: original images taken under identical acquisition settings. Note: fluorescence is highest in line EG11. Scale bars: 50 μ m. **b**, Quantification of Nb23:EGFP and EGFP from lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4. Fluorescence was quantified in soluble leaf extracts from transgenic lines and compared to fluorescence produced from known amounts of purified Nb23:EGFP and EGFP expressed from *E. coli*. TSP: total soluble proteins. Values are means \pm s.d. ($n = 5$ except for plant line EG11-3 $n = 2$). **c**, Immunoblot analysis of Nb23:EGFP and EGFP produced by lines EG11-3, 23EG16-9 and 23EG38-4. Total soluble proteins from leaves of EG11-3 (0.25 mg fresh tissue equivalent, lanes 1, 2), 23EG16-9 (7.5 mg fresh tissue equivalent, lanes 4 to 8) and 23EG38-4 (7.5 mg fresh tissue equivalent, lanes 10 to 14) plants were probed with anti-GFP antibodies. Semi-purified Nb23:EGFP expressed from *E. coli* was used as size control (40 ng, lane 9) for Nb23:EGFP (black arrowhead) and EGFP (empty arrowhead). Bottom panel: equal loading control assessed by Coomassie blue staining of total proteins. Lane 3: ladder with protein size indicated at the right. **d**, Relative accumulation of EGFP/Nb23:EGFP transcripts determined by RT-qPCR in leaves of 6- to 8-week-old plants from lines EG11-3, 23EG16-9, 23EG38-4 and wild type (WT) plants shown as box plot ($n = 3$ except for plant line 23EG38-4 $n = 7$). Plus sign corresponds to mean value, horizontal bar to median value and whiskers to lowest or highest values within 1.5 interquartile range of the lower or higher quartile.

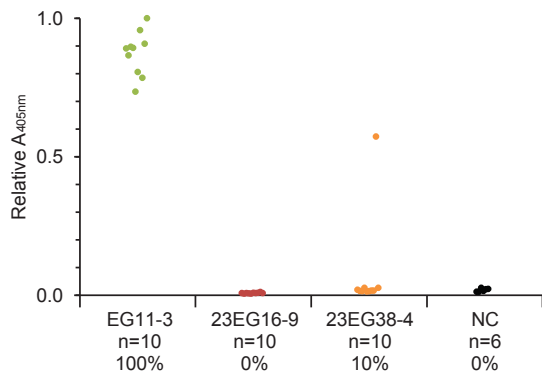


Extended Data Fig. 5 | Evaluation of the resistance of transgenic *N. benthamiana* T2 lines

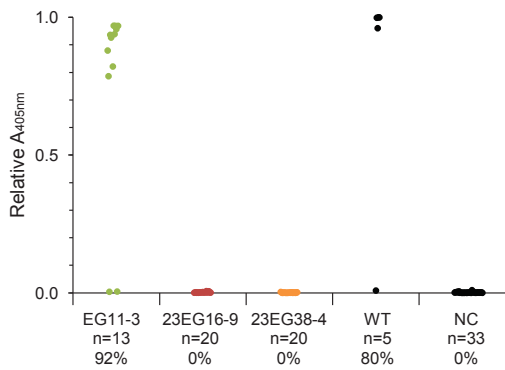
23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by GFLV-GHu or ArMV-S. **a**, Assessment of GFLV-GHu symptoms of mechanically inoculated 23EG16-9, 23EG38-4, EG11-3 and WT *N. benthamiana* at 7 dpi. WT and EG11-3 lines showed mosaic symptoms on systemic leaves whereas 23EG16-9 and 23EG38-4 lines remained asymptomatic. **b**, Anti-GFLV and **c**, anti-ArMV DAS-ELISA performed at 21 dpi on upper non-inoculated leaves from EG11-3, 23EG16-9, 23EG38-4 and WT plants. Each spot corresponds to a single sample and represents the mean relative absorbance at 405 nm of experimental duplicates. Number of plants tested (GFLV: $n = 20$ except for WT, $n = 10$ and NC, $n = 8$. ArMV: $n = 10$ except for NC, $n = 4$) and percentage of infection (%) are provided below each column. Plant 23EG38-4#17 testing GFLV positive by ELISA is indicated. Non-inoculated plants were used as negative control (NC). **d**, Relative accumulation of GFLV RNA1 (gray bars) and EGFP/Nb23:EGFP transcripts (white bars) determined by RT-qPCR in individual plants from line 23EG38-4. Values are means \pm s.d. ($n = 3$). GFLV RNA1 is detected in plant #17 only. RT-qPCRs results from plant #11 were inconclusive and are therefore not shown. All inoculations were performed with 300 ng of purified GFLV-GHu or ArMV-S.



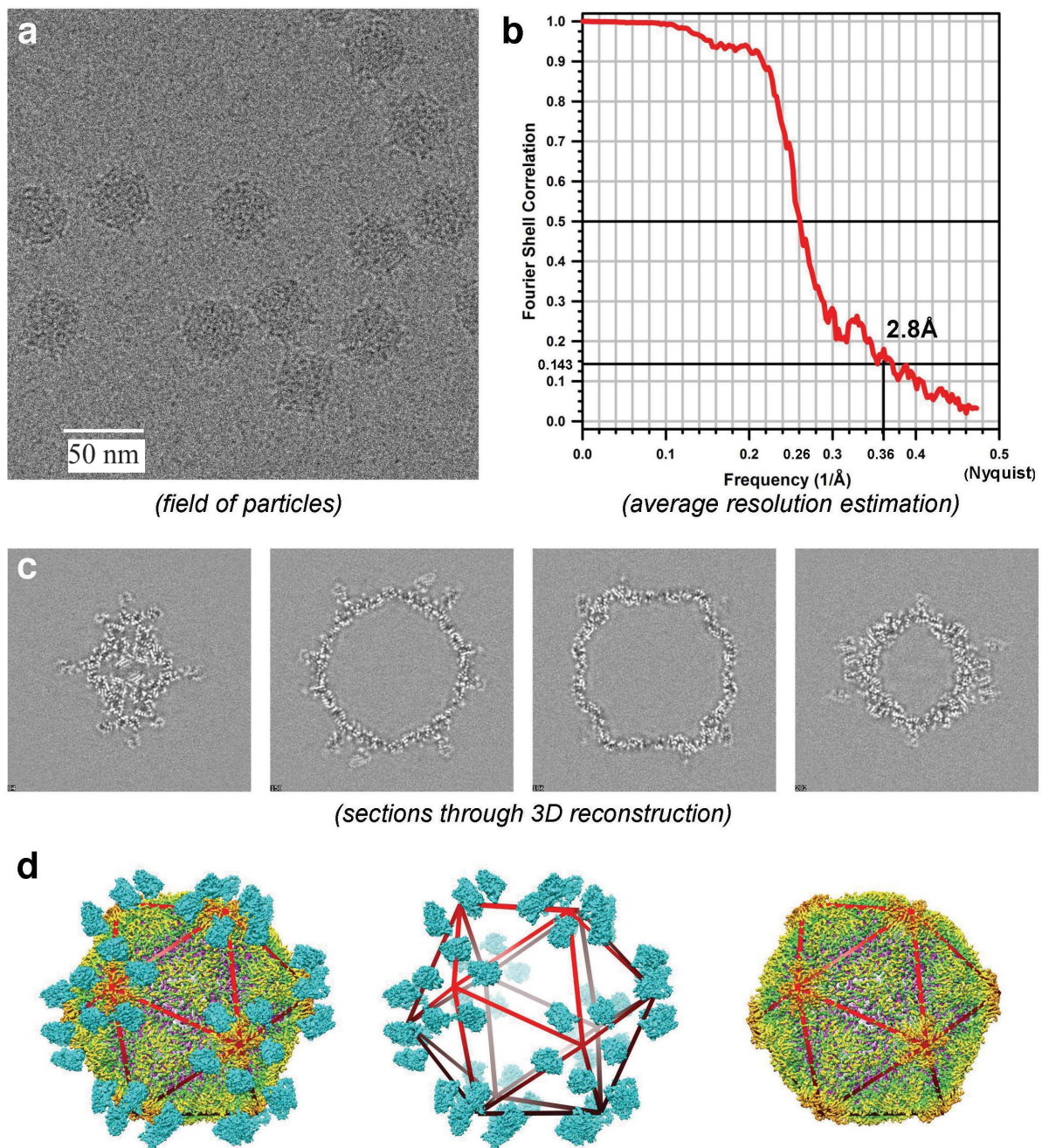
Extended Data Fig. 6 | Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by various GFLV isolates. EG11-3 (green), 23EG16-9 (red) and 23EG38-4 (orange) plants were mechanically inoculated with sap from *C. quinoa* plants infected with GFLV isolates -GHu, -F13, -B844, -TD, -CO2, -BUCharT60, -BE4.11 and -BE5.19 and apical non-inoculated leaves analyzed by DAS-ELISA at 21 dpi. Each dot corresponds to a single sample and represents the mean relative absorbance at 405 nm of experimental duplicates. Non-inoculated plants were used as negative control (NC, $n = 17$). For each set of inoculation, a total of 12 plants were tested, except for GFLV-GHu (24 plants). Percentage of infection is indicated below each column. Note EG11-3 plants are fully susceptible to GFLV, whereas line 23EG16-9 is 100% resistant to all GFLV isolates. Altogether only three plants out of 108 tested positive for GFLV in line 23EG38-4.



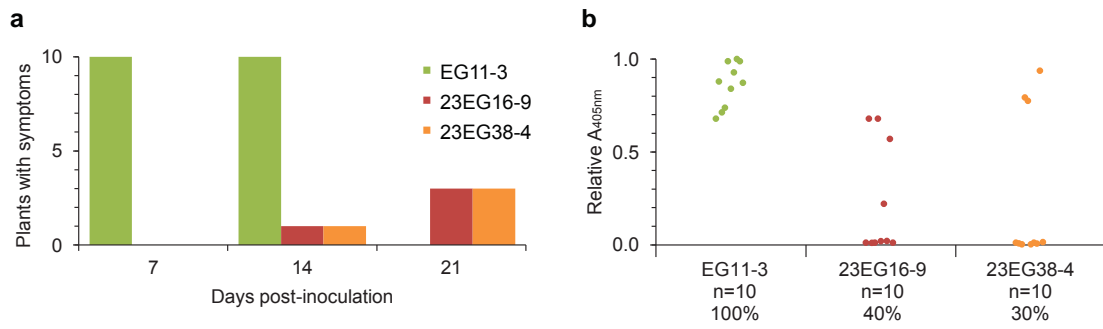
Extended Data Fig. 7 | Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to infection by viral RNA. EG11-3 (*n* = 10), 23EG16-9 (*n* = 10) and 23EG38-4 (*n* = 10) plants were mechanically inoculated with 360 ng of GFLV-GHu viral RNA and apical non-inoculated leaves analyzed by DAS-ELISA at 21 dpi. Each dot corresponds to a single sample and represents the mean relative absorbance at 405 nm of experimental duplicates. Non-inoculated plants were used as negative control (NC, *n* = 6). Number of plants tested (*n*) and percentage of infection (%) are indicated below each column. Note that line 23EG16-9 is fully resistant to viral RNA whereas only one plant tested positive for GFLV in line 23EG38-4.



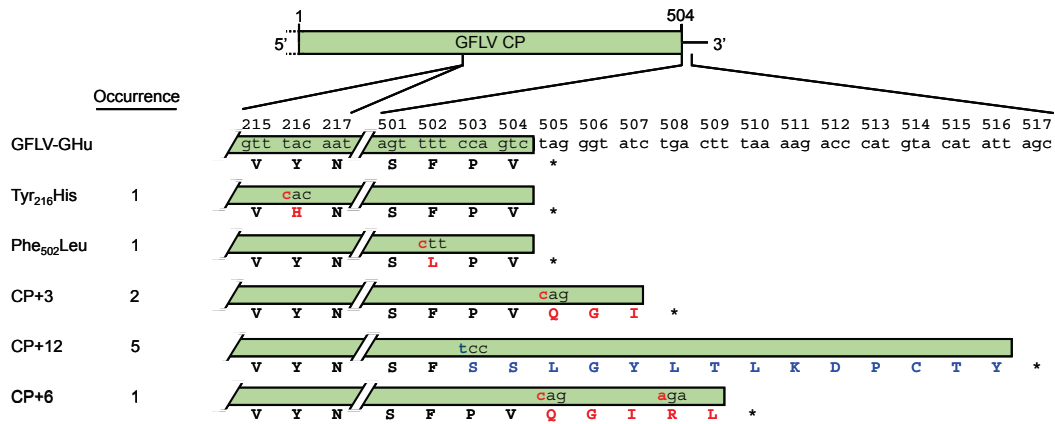
Extended Data Fig. 8 | Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to GFLV inoculation by *X. index*. EG11-3 (green, $n = 13$), 23EG16-9 (red, $n = 20$), 23EG38-4 (orange, $n = 20$) and WT ($n = 5$) plants were grown in soil containing GFLV-F13-positive nematodes. Plants of each genotype maintained in contact with aviruliferous *X. index* were included as negative control (NC, $n = 33$). DAS-ELISA analysis of GFLV in leaves from the same plants was performed 16 weeks after initial contact with nematodes. Relative absorbance values of individual samples are indicated for each plant line. Each dot corresponds to a single sample and represents the mean relative absorbance at 405 nm of experimental duplicates. Number of plants tested (n) and percentage of infections (%) are provided below each column. Note the absence of systemic infection in lines 23EG16-9 and 23EG38-4. In the initial design of the experiment, transmission test included twenty EG11-3 plants but due to improper gardening, seven died in the course of the experiment and were therefore excluded from DAS-ELISA analysis.



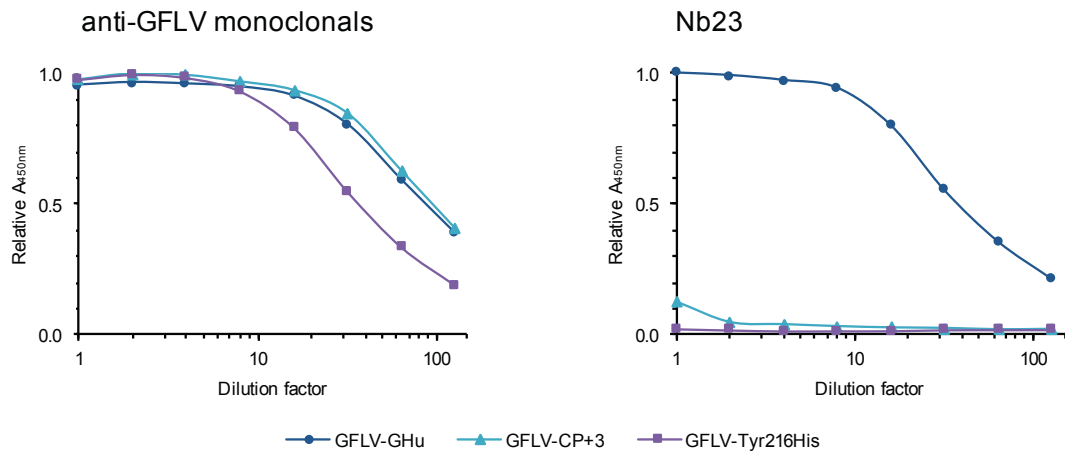
Extended Data Fig. 9 | Cryo-EM micrographs and estimation of the resolution of the GFLV-Nb23 complex. **a**, Typical cryo-EM micrograph of the GFLV-Nb23 complex. **b**, Plot showing Fourier shell correlation (FSC) versus spatial frequency of the icosahedrally averaged reconstruction. Average resolution of the reconstructions is given where the FSC curve crosses below a correlation value of 0.143. **c**, Sections through the 3D reconstruction. **d**, Segmentation of the 3D reconstruction showing left to right the full complex, the Nb23 (cyan) and the GFLV capsid.



Extended Data Fig. 10 | Evaluation of the resistance of T2 lines 23EG16-9 and 23EG38-4 to GFLV at high pressure of inoculum. EG11-3 (*n* = 10), 23EG16-9 (*n* = 10) and 23EG38-4 (*n* = 10) plants were mechanically inoculated with 3 μ g of GFLV-GHu. **a**, Symptoms assessment at 7, 14 and 21 dpi. **b**, GFLV detection by DAS-ELISA at 21 dpi. Relative absorbance values of individual samples are indicated for each plant line. 10 plants were tested for each set of inoculum. Each dot corresponds to a single sample and represents the mean relative absorbance at 405 nm of experimental duplicates. Percentage of infection is indicated below each column (%). Note the delay in symptoms appearance and the reduced number of infected plants in lines 23EG16-9 and 23EG38-4 compared to EG11-3.



Extended Data Fig. 11 | Mutations found in GFLV escape variants. Escape GFLV variants were sequenced and mutations were found in the open reading frame encoding the CP of GFLV. Mutations resulting from substitutions and insertions are indicated in red and blue, respectively. In total, the sequences of ten independent escape variants were obtained and the occurrence of mutations is provided for each type of mutant. Nucleotide sequence of GFLV-GHu from residues 215 to 217 and 501 to 517 is given. Open reading frames are highlighted in green and corresponding protein sequences provided below.



Extended Data Fig. 12 | Reduced affinity of Nb23 towards GFLV-CP+3 and GFLV-Tyr₂₁₆His.

Two-fold serial dilutions of crude extracts from *N. benthamiana* infected with GFLV-GHu (blue circles), GFLV-CP+3 (cyan triangles) or GFLV-Tyr₂₁₆His (purple squares) were tested by DAS-ELISA using commercial antibodies for coating and either monoclonal antibodies (Bioreba, left graph) or Nb23 (right graph) for detection. Note that detection signals (Y axis) are nearly identical for all virus isolates upon probing with monoclonal antibodies and clearly different with Nb23. With the latter, a sharp reduction in detection signal was observed for GFLV-CP+3 and GFLV-Tyr₂₁₆His, indicating reduced affinity of Nb23 for escape GFLV variants.

2.2 Remarques complémentaires

2.2.1 Présence de P19

Le choix de l'utilisation d'un vecteur exprimant un suppresseur de *silencing* pour l'élaboration d'un système d'évaluation des propriétés antivirales du Nb23 peut sembler, de prime abord, absurde et contre-productif. En effet, les suppresseurs de *silencing* constituent une stratégie développée par les virus pour contourner les défenses innées de la plante dans le but de favoriser leur multiplication. Il est donc légitime de penser que l'expression de la P19 du TBSV dans les *N. benthamiana* transformés avec les vecteurs pEAQ (Sainsbury *et al*, 2009) puisse provoquer une stimulation de l'infection capable de surmonter une quelconque résistance mise en place. En revanche, ces mêmes suppresseurs de *silencing* sont largement utilisés en sciences végétales appliquées et en biotechnologies pour contourner de la même manière les effets du *RNA silencing* afin d'exprimer des protéines hétérologues à des niveaux élevés et de façon prolongée dans les plantes. L'utilisation des Cb en plante est un domaine encore peu exploré (Schornack *et al*, 2009; Rocchetti *et al*, 2014) et le manque de recul sur la capacité des cellules végétales à les exprimer efficacement a déterminé ce choix, une expression sans induction de résistance étant préférable à une absence d'expression pour ce projet.

Considérant le fort niveau de résistance obtenu, cette prise de risque semble avoir été justifiée. De la même façon que le risque théorique de contournement de la résistance par des virus entrants codant pour un suppresseur de *silencing* ne s'est pas produit, ni au champ au cours d'un suivi de 10 ans, ni après inoculation par greffage, sur les lignées C5 de prunier résistantes au PPV (Ilardi & Tavazza, 2015), la P19 paraît ne pas avoir d'effet sur la sensibilité ou sur la résistance des lignées 23EG vis-à-vis du GFLV [Figure 4.2].

Rétrospectivement, le plus surprenant n'est pas tant d'être parvenu à obtenir de la résistance au GFLV avec ce système, mais d'être parvenu à obtenir des plantes capables de tolérer un tel système. L'application des suppresseurs de *silencing* viraux à la transgénése est généralement limitée en raison de leurs effets délétères connus sur la croissance et le développement des plantes (Silhavy *et al*, 2002; Scholthof, 2006; Siddiqui *et al*, 2008). La régénération de 46 lignées de *N. benthamiana* viables, fertiles et dépourvus de phénotype flagrant est surprenante en regard de l'incapacité des inventeurs des vecteurs pEAQ à faire de même sans muter la P19 au préalable (Saxena *et al*, 2011; Peyret & Lomonosoff, 2013). D'après l'analyse par RT-qPCR de 139 plantes appartenant à 14 lignées T1 et T2 de 23EG [Figure 4.2], seuls des transformants exprimant la P19 à des niveaux très faibles ont probablement été capables d'être régénérés. Cette hypothèse est étayée par des analyses par *western blot* qui n'ont permis de détecter que très sporadiquement la P19 et uniquement sous forme de dimère récalcitrant au SDS. Il est légitime de penser que, sous réserve d'une expression suffisante de Cb, des résultats similaires puissent être obtenus avec des constructions dépourvues du gène codant pour la P19. Finalement, le principal inconvénient de la présence de la P19 semble être de compliquer l'analyse de la contribution réelle du Nb23 dans la résistance au GFLV.

2.2.2 Mécanisme de la résistance

Selon la protéine ciblée, toutes les étapes du cycle infectieux d'un phytovirus (décapsidation, réplication, assemblage en particules, mouvement local et à longue distance ou encore transmission) peuvent théoriquement être inhibées par l'expression d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps neutralisant. L'ampleur de l'inhibition dépend généralement du titre de l'anticorps dans la plante qui est

fonction de son niveau d'expression et de sa stabilité, de sa localisation qui doit idéalement correspondre au site de multiplication virale et de son efficacité de reconnaissance qui comprend son affinité et son avidité (Safarnejad *et al*, 2011).

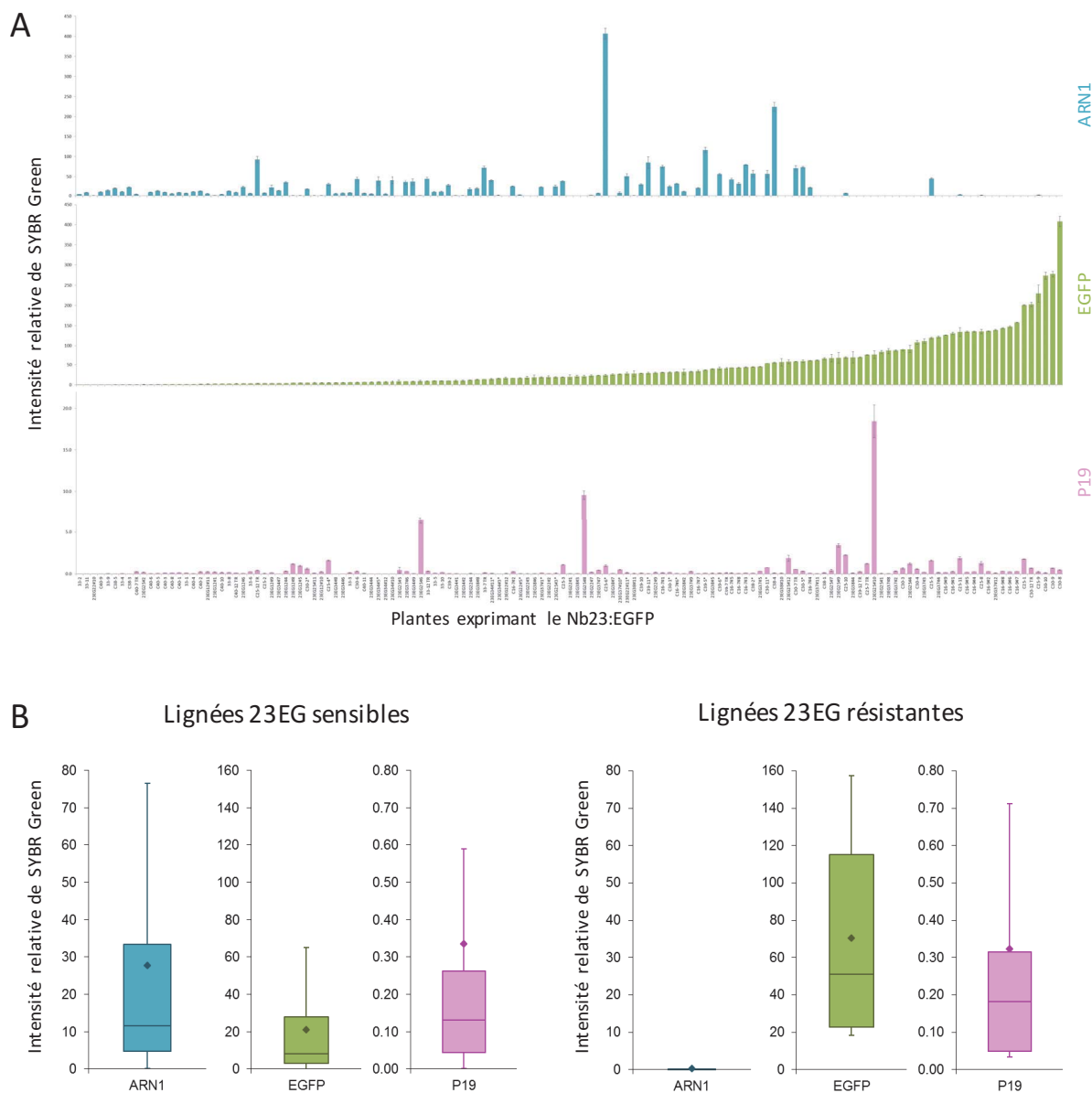


Figure 4.2 | Analyse par RT-qPCR de l'accumulation de l'ARN1 du virus challenger et des transcrits de Nb23:EGFP et de P19 dans les lignées 23EG.

A. Le niveau d'accumulation de l'ARN1 du GFLV et des transcrits de P19 et de Cb (EGFP) a été analysé par RT-qPCR sur 5 à 12 plantes de 12 lignées T1 et 2 lignées T2, classées dans l'ordre croissant de l'expression du Cb. Une tendance à une résistance accrue pour les lignées accumulant le plus de transcrits de EGFP semble se dégager. **B.** Représentation en *box plot* des mêmes résultats divisés en lignées sensibles (à gauche) et en lignées résistantes (à droite) montrant que l'accumulation de transcrits de P19 n'a pas d'impact sur l'accumulation du virus alors que les transcrits de Cb semblent s'accumuler d'avantage dans les lignées résistantes. Les losanges correspondent à la valeur moyenne et les segments représentent 1,5 fois l'écart interquartile.

De façon attendue pour une résistance induite par un anticorps, la résistance au GFLV induite par l'expression de Nb23:EGFP est directement liée à la reconnaissance spécifique et à l'affinité du Nb23 pour la CP du GFLV [Extended Data Fig. 12]. En accord avec la description, dans la littérature, de

stratégies de résistance exploitant l'expression de *plantibodies* (Boonrod *et al*, 2004; Nölke *et al*, 2009), on s'attendrait également à observer un niveau de résistance dépendant de la quantité de Cb. Le fait qu'on n'ait pas observé, avec le challenge des deux lignées stabilisées, de comportements intermédiaires mais une résistance à 100 %, parfois contournée, rend cependant difficile l'étude de cet éventuel effet dose-dépendant. Une corrélation entre l'accumulation de transcrits de Cb et le niveau d'accumulation de l'ARN1 a pu être établie par RT-qPCR pour une lignée T1 [Figure 4.3], mais n'a pas pu être confirmée pour les autres lignées analysées jusque-là. Globalement, même si la règle n'est pas absolue, une tendance semble se dessiner faisant apparaître que plus il y a de transcrits de Cb détectés dans une plante, moins celle-ci est susceptible de développer une infection [Figure 4.2 | A]. De plus, la mise en évidence d'un éventuel effet dose du Nb sur la résistance est compliqué ici par l'émergence de contournants de la résistance qui n'ont pas été caractérisés dans les lignées T1. À la vue des résultats obtenus avec les lignées 23EG16-9 et 23EG38-4, pour lesquelles la quasi totalité des évènements d'infection ont pu être imputés à des mutations de la capsid affaiblissant la reconnaissance par le Nb23, il est facile d'imaginer qu'il en fut de même pour chaque infection relevée avec les lignées T1. Dans ce cas, selon la nature de la mutation, et selon la baisse d'affinité pour le Nb23 qu'elle provoque, la résistance peut être contournée (ou non) avec des quantités très différentes de Nb23 exprimées. Pour relier plus sûrement un niveau de résistance à une quantité de Cb il faudrait d'une part une quantification des Cb au niveau des protéines plutôt qu'au niveau des transcrits et il faudrait d'autre part inoculer des lignées T1 avec un même contournant caractérisé.

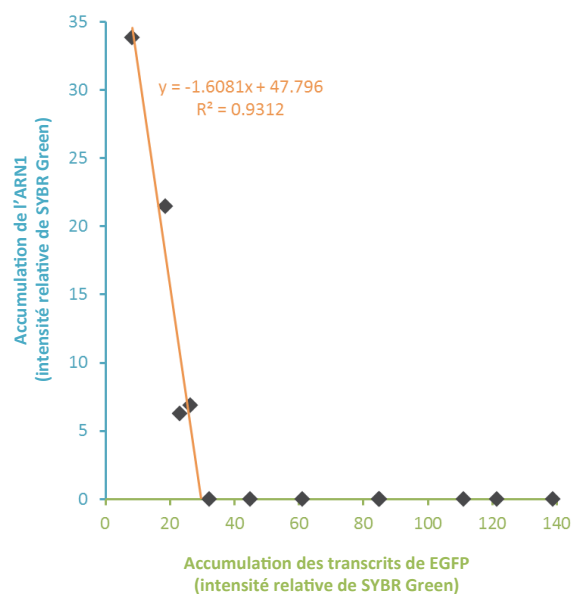


Figure 4.3 | Relation entre accumulation des transcrits du Cb et accumulation virale dans les plantes de la lignée T1 23EG37.

La relation entre le niveau d'accumulation du Cb (évalué par RT-qPCR avec des amorces dérivées de la séquence du gène codant pour la EGFP, en abscisse) et la multiplication virale (mesurée par l'accumulation de l'ARN1, en ordonnée) se décompose en une corrélation linéaire inversement proportionnelle (droite de régression orange) jusqu'à un seuil au delà duquel l'ARN1 n'est plus détectable.

La différence de réponse à l'infection observée entre la lignée 23EG16-9, complètement immune sauf sous forte pression d'inoculum, et la lignée 23EG38-4, plus propice à l'émergence de mutants, est également difficile à comprendre. Les mutants séquencés à partir des quatre plantes infectées de la lignée 23EG16-9 correspondent aux mêmes extensions CP+3 et CP+12 que celles identifiées à partir des huit plantes infectées de la lignée 23EG38-4. L'expression et/ou l'accumulation moyenne de Cb n'apparaît pas

significativement différente entre les deux lignées avant [Extended Data Fig. 4 | b, d] ou après infection [Figure 4.4] pour pouvoir expliquer cette différence. Ces analyses mesurent en revanche une expression globale sur toute l'épaisseur de disques foliaires ce qui pourrait masquer un différentiel d'expression tissu-dépendant du Cb entre les deux lignées, susceptible de faciliter la réplication et l'évolution du virus dans la lignée 23EG38-4.

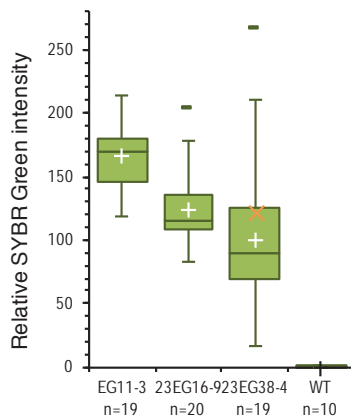


Figure 4.4 | Analyse de l'accumulation des transcrits de Cb dans les plantes des lignées T2 homozygotes 23EG16-9 et 23EG38-4 après confrontation avec le GFLV.

Une différence globale du niveau d'accumulation du Nb23:EGFP (évalué par RT-qPCR avec des amorces dérivées de la séquence du gène codant pour la EGFP) ne semble pas pouvoir expliquer la plus grande fréquence de contournement de la résistance observée dans la lignée 23EG38-4 par rapport à la lignée 23EG16-9. La croix orange correspond à la plante 23EG38-4#17 qui était la seule plante exprimant le Nb23:EGFP infectée à l'issue de l'expérience. Les croix blanches correspondent à la valeur moyenne, les segments représentent 1,5 fois l'écart interquartile et les tirets les valeurs extrêmes.

L'incapacité à visualiser des foyers d'infection sur les feuilles de plantes 23EG16-9 sur lesquelles du GFLV-2ATR a été inoculé [Fig. 1] évoque un mécanisme de résistance intervenant en amont du mouvement de cellule à cellule. Ce mécanisme reste à déterminer, mais peut néanmoins se révéler complexe car toutes les étapes du cycle où intervient la CP sont susceptibles d'être perturbées de façon exclusive ou concomitante par la fixation du Nb23. Un épais faisceau de présomptions suggère que le Cb inhibe la décapsidation du GFLV. En effet, aucun site d'infection n'a été observé sur feuilles inoculées et, malgré une inspection attentive, aucune cellule isolée exprimant la 2ATR du GFLV n'a été repérée alors que des sites d'infection ont aisément été observés sur les plantes témoins. Des études complémentaires à partir de protoplastes transfectés avec des particules virales purifiées ou avec de l'ARN viral devraient permettre de déterminer avec plus de certitude l'impact du Nb23 sur la décapsidation du GFLV.

De façon plus inattendue aucune cellule isolée n'a présenté de fluorescence rouge suite à l'inoculation d'ARN totaux extraits de plantes infectées par le GFLV-2ATR. Il est donc possible d'imaginer que le Nb23 a également un impact sur la réplication du GFLV. L'inoculation de transcrits de GFLV-2ATR, en parallèle avec l'inoculation de transcrits de GFLV-2ATR Δ CP (pour servir de témoin d'infection limitée à une cellule) devrait confirmer un éventuel effet du Nb23 sur la réplication. Si cette étape de réplication est inhibée par le Cb, l'évolution du virus s'en trouve limitée et les infections dans les lignés Cb pourraient alors être également dues à des mutants de contournement déjà présents dans les inoculum utilisés. Sur plus de 250 séquences de 2C^{CP} du GFLV complètes publiées à ce jour dans la base de données de séquences américaine (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) aucune extension n'a jamais été décrite. En revanche six variants naturels avec des mutations aux positions Tyr₂₁₆ et Phe₅₀₂ sont déjà publiés (Tyr₂₁₆Cys (Vigne *et al*, 2004), Phe₅₀₂Leu (accession

AGN29363.1, (Vigne *et al*, 2004; 2009; Lamprecht *et al*, 2013) et Phe₅₀₂Ser (Vigne *et al*, 2009)). Avec les connaissances actuelles du cycle répliatif du GFLV, et sachant qu'en protoplastes le GFLV-ΔCP se réplique bien (Belin *et al*, 1999; Schellenberger *et al*, 2010), il est difficile de comprendre comment un anticorps dirigé contre la CP peut perturber la répliation. Cependant des expériences préliminaires d'expression transitoire de la polyprotéine P2 en présence ou en absence de protéase dans des plantes de la lignée 23EG16-9 semblent suggérer une reconnaissance de la P2 par le Nb23 qui pourrait perturber son rôle dans la répliation [Figure 4.5]. Ces expériences devront être répétées et complétées par une vérification moléculaire de l'intégrité de la P2 qui semble reconnue par les Cb.

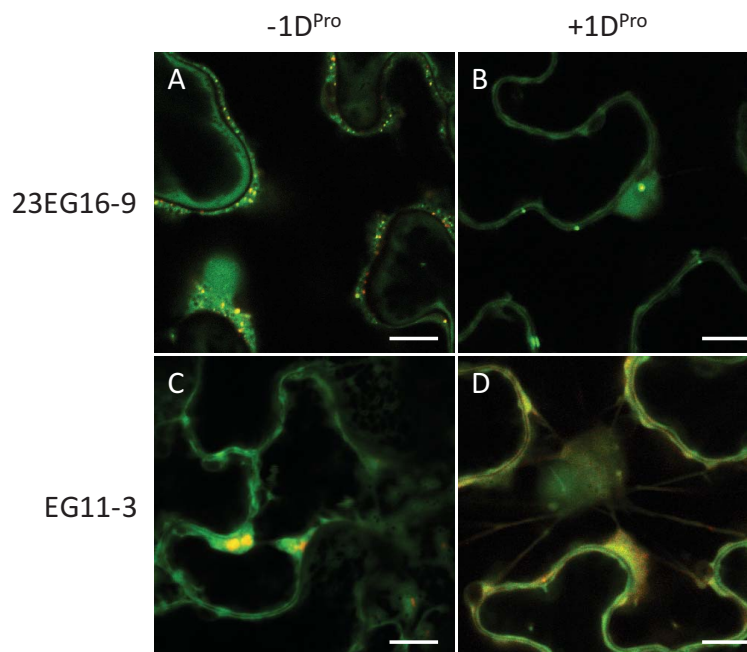


Figure 4.5 | Le Nb23:EGFP semble relocalisé par l'expression transitoire de la P2.

Observation par microscopie confocale de plantes des lignées T2 23EG16-9 (A et B) et EG11-3 (C et D) (signal vert) infiltrées avec des agrobactéries permettant l'expression de la P2-2ATR (signal rouge) en absence (A et C) ou en présence (B et D) de la protéase virale 1D^{Pro}. Barres d'échelle : 10 μm.

Dans le cas où la répliation du GFLV serait mise en évidence dans des protoplastes exprimant le Cb, il conviendrait de vérifier l'impact du Nb23 sur l'encapsidation du GFLV en recherchant la présence de particules virales dans ces protoplastes par microscopie électronique (*ImmunoSorbent Electron Microscopy*, ISEM).

Le mouvement du GFLV est la dernière étape du cycle viral avec laquelle le Nb23 pourrait interférer avant la propagation du virus dans la plante. Le Cb pourrait bloquer le mouvement soit par encombrement stérique en empêchant les particules de passer à travers les tubules soit par interférence au niveau de la reconnaissance entre la capsid et la MP par compétition avec un site d'interaction ou par perturbation conformationnelle.

Le mécanisme de résistance pourrait être plus vaste que la seule perturbation d'une ou de plusieurs étapes du cycle viral et faire intervenir une dégradation des complexes Cb/GFLV. Si les étapes précédant le mouvement de cellule à cellule ne sont pas totalement impactées, il serait en effet intéressant de connaître le devenir des complexes Cb/GFLV formés. Pour répondre à cette question, il est possible d'utiliser des inhibiteurs des voies cellulaires classiques de dégradation tels que le complexe ubiquitine-protéasome (Callis, 2014), l'autophagie (Li & Vierstra, 2012) (déjà décrite comme prenant part dans certaines infections virales) ou le stockage vacuolaire. Une réponse de type stress lié à l'accumulation de

protéines mal repliées (*unfolded protein response*, UPR) pourrait également intervenir comme décrit lors de l'expression de Nb dans des graines d'*A. thaliana* (De Wilde *et al*, 2013).

Les questions qui restent à ce jour en suspens concernant le mécanisme de résistance induite par le Nb23 rendent difficile la prédiction d'un éventuel effet neutralisant pour un Nb donné. Il est possible qu'il y ait mise en œuvre de mécanismes légèrement différents selon les Nb considérés, notamment selon que leur épitope couvre une seule sous-unité de la capsidie comme c'est le cas pour le Nb23 ou en chevauche plusieurs. Il serait intéressant d'étudier l'effet stabilisant de chacun des Nb de la collection. Un parallèle pourrait être fait avec la neutralisation des rhinovirus par certains inhibiteurs qui, en se logeant au fond d'une cavité située dans le canyon à la base des pentamères, rigidifient la conformation de la capsidie et en bloquent le désassemblage normalement provoqué par l'interaction avec le récepteur ICAM-1 (De Palma *et al*, 2008). Cependant, une corrélation directe entre pouvoir neutralisant et activité stabilisatrice de Nb dirigés contre le poliovirus n'a pas pu être démontrée (Schotte *et al*, 2014).

2.2.3 Perspectives du contournement de la résistance

Tous les mutants de contournement séquencés comportent des mutations modifiant la surface de la capsidie dans la zone d'interaction avec le Nb23 [Figure 4.6]. Le séquençage des virus extraits de deux plantes infectées par le GFLV mentionnées dans l'article est encore en cours. Les résultats préliminaires révéleraient pour l'un d'entre eux des mutations Asp₃₇₁Asn et Ala₃₈₇Thr, ce qui semble en accord avec la structure du complexe, mais demandent encore vérification. La majorité des mutations correspondent de façon remarquable à des extensions, et plus particulièrement à un ajout de 12 acides aminés [Extended Data Fig. 11]. Ce type de mutation n'a jamais été documenté à l'état naturel pour le GFLV ce qui, considérant la perte de transmissibilité du contournant GFLV-CP+3, pourrait traduire une sélection négative de ces variants au vignoble lors de l'étape de transmission.

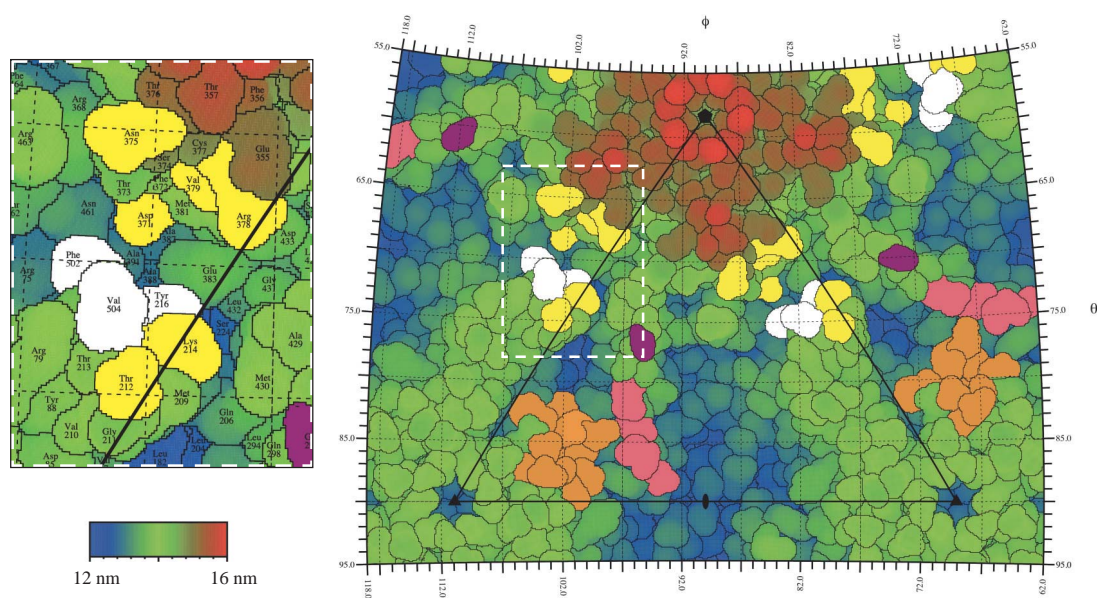


Figure 4.6 | Empreinte du Nb23 sur la capsidie du GFLV-F13.

Les acides aminés sont représentés sur une projection stéréographique de la capsidie (longitude ϕ et latitude θ) en fonction de leur altitude par rapport au centre de la particule, les positions les plus protubérantes étant colorées en rouge et les plus profondes en bleu. Le triangle noir montre une unité asymétrique où les axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2 sont respectivement indiqués par un pentagone, un triangle et un ovale noirs. Les acides aminés colorés en jaunes correspondent aux points de contact du Nb23 avec la capsidie et les résidus impactés par les mutations permettant d'échapper à la résistance sont colorés en blanc. Les résidus essentiels à la spécificité de transmission du GFLV par *X. index* sont indiqués en orange (Schellenberger *et al*, 2010), violet (Schellenberger *et al*, 2011) et rose (Belval *et al*, 2015).

Dans le cas du contournant GFLV-CP+3, la visualisation par ISEM de particules virales dans des extraits de feuilles systémiques de *N. benthamiana* infectés par le GFLV-CP+3 [Figure 4.7], effectuée par Lorene BELVAL, confirme que des capsides comportant une extension sont effectivement formées, même en présence de Cb qui ne semblent pas empêcher leur assemblage, et que le contournement de la résistance n'est vraisemblablement pas dû à un mouvement du GFLV sous forme de RNP. De façon inattendue, les Nb se sont ainsi avérés être des outils performants pour réaliser de l'évolution moléculaire dirigée au niveau de la capsidite du GFLV. Le contournement de la résistance induite par le Nb23 a abouti à la création de mutants viables dont l'obtention par une approche candidat classique serait fastidieuse ou difficile à envisager en première intention. Cela a permis de générer facilement de nouveaux mutants de la capsidite dont la transmissibilité est en cours d'évaluation. La démonstration de la perte de transmissibilité du GFLV-CP+3 par *X. index* a déjà permis de confirmer l'importance dans la spécificité de transmission du GFLV, suspectée mais jamais démontrée faute de mutants fonctionnels, de la région R3 qui est située au même niveau d'après la structure résolue de la capsidite (Schellenberger *et al*, 2010; 2011).

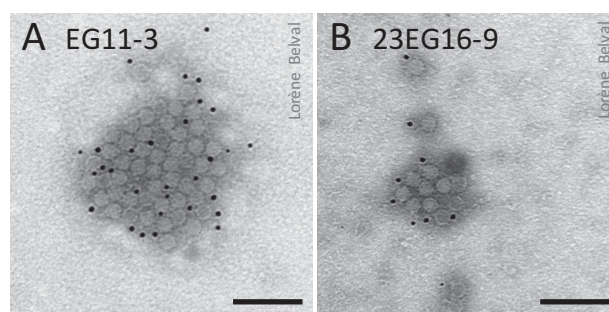


Figure 4.7 | Détection par ISEM de particules virales de GFLV-CP+3 dans des plantes transgéniques EG11-3 (A) et 23EG16-9 (B).

Les particules virales d'un jus clarifié de feuilles apicales prélevées 14 jours après inoculation avec le GFLV-CP+3, ont été immobilisées avec des anticorps polyclonaux anti-GFLV et décorées avec un anticorps monoclonal anti GFLV puis avec un anticorps anti-souris couplé à des billes d'or. La présence de trois résidus supplémentaires en fin de CP semble compatible avec la formation de particules virales. Barres d'échelle : 100 nm.

L'extension en C-terminal de la CP de 3 et même 12 acides aminés a aussi ouvert des perspectives nanotechnologiques nouvelles pour le GFLV (Pushko *et al*, 2013; Saunders & Lomonosoff, 2013; Peyret *et al*, 2015). Suite au constat que des extensions de la capsidite ne perturbent pas le cycle infectieux du GFLV, la fusion de la 2C^{CP} à la TagRFP a été réalisée par Corinne KEICHER dans le clone infectieux du GFLV pour tester sa compatibilité avec l'ensemble des étapes du cycle de multiplication du virus (cf Chapitre 5 : Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV).

L'émergence de contournants de la résistance peut également être exploitée pour établir la cartographie des épitopes de la collection de Nb spécifiques du GFLV. En effet, en combinant la gamme des isolats de GFLV reconnus par les différents Nb et les contournants qu'ils engendrent, il est envisageable de situer les zones probables de contact sur une carte RIVEM de la capsidite [Figure 4.8]. Cependant, arriver à tirer parti de l'ensemble des Nb disponibles nécessite la mise au point d'une technique d'évaluation de la résistance s'affranchissant de la longue étape de génération de plantes transgéniques. Or à l'heure actuelle, un système d'évaluation par expression transitoire (Ghannam *et al*, 2015) du Nb23 n'a permis d'observer qu'un retard d'apparition des symptômes, probablement en raison de la propension du Nb à s'agréger.

Lors des expériences de confrontation des plantes transgéniques avec le GFLV-GHu, quelques plantes de différentes lignées 23EG ont présenté de façon remarquable des symptômes atypiques avec

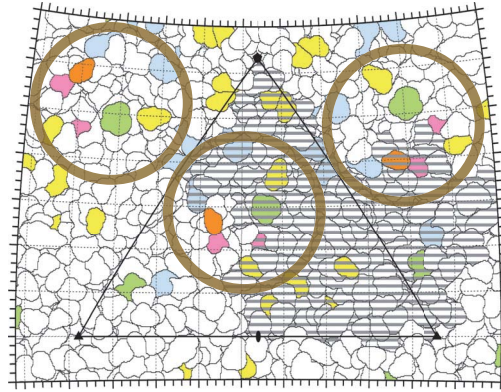


Figure 4.8 | Cartographie putative de l'épitope du Nb122.

En comparant les acides aminés qui diffèrent entre le GFLV-F13, reconnu par le Nb122, et des souches ou des isolats qui ne sont pas ou peu reconnus par ce Nb, un épitope à cheval sur deux sous-unités peut être proposé (cercles bruns). Les résidus qui divergent entre le GFLV-F13 et les autres souches ou isolats sont colorés sur une projection 2D de la capsid où la surface d'une sous-unité est hachurée en gris (jaune : GFLV-GHu, bleu : GFLV-BYM147, vert : résidus communs entre le GFLV-GHu et le GFLV-BYM147, orange : GFLV-TD, rose : résidus de deux mutants de GFLV-F13 contournant la résistance induite par l'expression du Nb122).

des décolorations larges le long des nervures [Figure 4.9]. Ces symptômes n'ont jamais été observés avec des lignées EG et ne sont donc pas liés à la présence de la P19. La CP n'étant pas connue comme un déterminant de la symptomatologie sur *N. benthamiana*, il est difficile d'expliquer ces symptômes par la pression de sélection exercée par le Nb sur la CP. Dans l'éventualité où la reconnaissance de la CP au sein de la P2 serait confirmée, on pourrait envisager que cette reconnaissance participerait à modifier le ratio RNA1/RNA2 plutôt que le niveau global de la réplication. Le séquençage du génome viral réalisé sur des plantes présentant ce genre de symptômes sera donc probablement très informatif pour l'étude du déterminisme des symptômes.

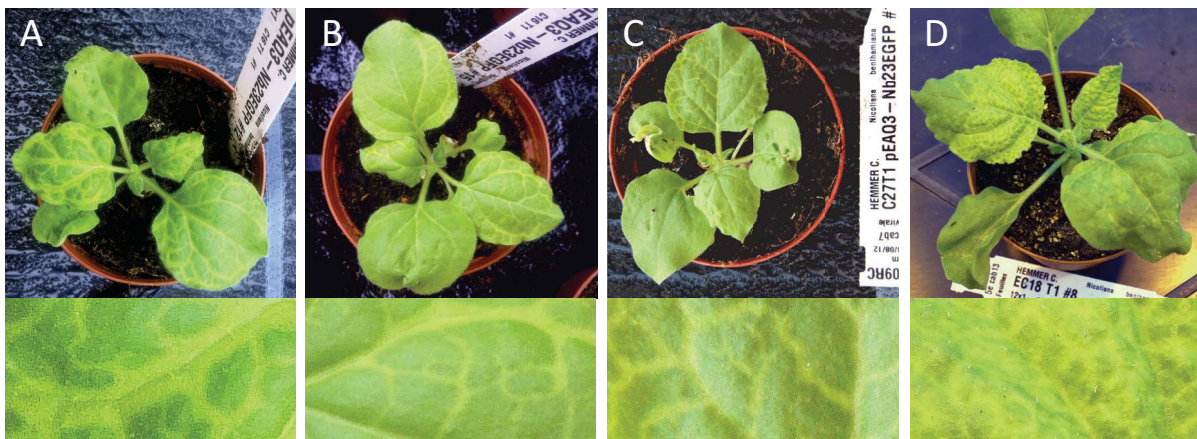


Figure 4.9 | Symptômes atypiques parfois observés sur les plantes transgéniques exprimant le Nb23:EGFP.

Un éclaircissement entourant largement les nervures principales et secondaires est observé de la base à la pointe des premières feuilles systémiques sur les plantes transgéniques des lignées 23EG (A, B, C). Ces symptômes sont différents des mosaïques classiquement visualisées (D).

Enfin, l'obtention de variants contournant la résistance dans les plantes Cb, et notamment du GFLV-CP+3 ouvre la voie de l'utilisation des plantes transgéniques pour le suivi de l'infection. En effet, bien que le Nb23:EGFP n'induit pas de résistance dans les plantes infectées par le GFLV-CP+3 [Table 1] et qu'il présente une affinité fortement réduite pour ce mutant, il est pourtant relocalisé en sa présence [Figure 4.10]. Cette combinaison lignée 23EG16-9/GFLV-CP+3 constitue ainsi un matériel

caractérisé de choix pour réaliser un suivi dynamique de l'infection. En plus de l'introduction de cette mutation dans le clone infectieux GHu, cette mutation a également été sous-clonée dans le clone infectieux GFLV-F13-2ATR (cf Chapitre 5 : Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV).

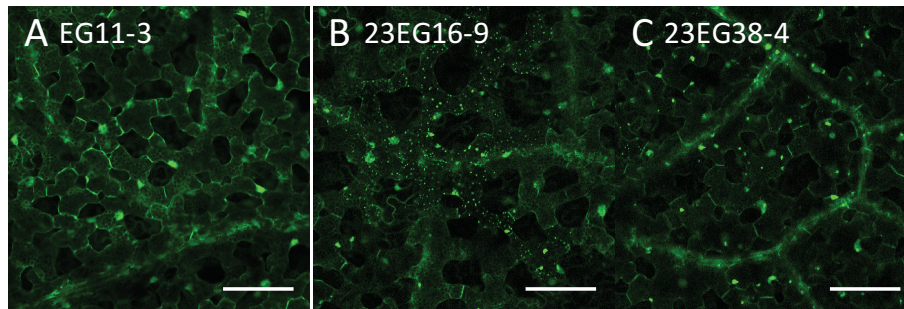


Figure 4.10 | Relocalisation du Nb23:EGFP par le mutant GFLV-CP+3.

Le variant GFLV-CP+3 a été inoculé à des plantes transgéniques des lignées EG11-3 (A), 23EG16-9 (B) et 23EG38-4 (C). Tandis que la EGFP libre conserve une localisation nucléo-cytoplasmique diffuse, le Nb23:EGFP est relocalisé sous forme de ponctuations et d'agrégats, indiquant une reconnaissance du variant GFLV-CP+3 par le Nb23 en dépit d'une diminution notable du signal obtenu par ELISA. Barres d'échelle : 100 µm.

Chapitre 5

Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV

1 Comment suivre une infection virale ?

1.1 Pourquoi et comment visualiser un virus *in vivo* ?

Les virologues ont toujours cherché à visualiser les infections virales ou à localiser les virus dans leurs hôtes, de façon grossière par des analyses sur des fractions de plantes et de tissus ou de manière plus précise par la recherche des localisations subcellulaires. Ces études, réalisées par microscopie électronique, par immuno-empreinte, par immunomarquage, par hybridation *in situ*, ou de façon plus anecdotique par thermographie (Chaerle *et al*, 1999), ont des objectifs très variés. Elles visent à mieux appréhender la distribution du virus dans son hôte pour réduire le risque de diagnostiquer des "faux négatifs", à lier la présence du virus à des symptômes ou à des modifications plus fines, à étudier le mouvement de cellule à cellule ou à longue distance ou encore à comprendre la transmission des virus par leur vecteur (Gosalvez-Bernal *et al*, 2008; Knapp *et al*, 1995; Havelda *et al*, 2008; Vuorinen *et al*, 2011). Bien que ces techniques ont été, et sont toujours, d'une très grande utilité en virologie, elles sont destructrices pour les échantillons et ne permettent pas un suivi dynamique *in vivo*. Plus récemment, des techniques à la frontière de la biologie et de la physique ont émergé permettant de suivre des nanoparticules virales dans les plantes. C'est le cas notamment des capsides du *Brome mosaic virus* (BMV) qui ont été modifiées pour être utilisées dans des expériences d'imagerie par résonance magnétique (Huang *et al*, 2011) afin de suivre le trajet des particules dans les nervures des feuilles. Les nanocristaux de *quantum dots*, constitués d'un cœur de séléniure de cadmium recouvert de plusieurs couches de sulfure de zinc, ont également été détournés de leur utilisation initiale dans le domaine des semi-conducteurs, pour leur propriété d'émission de lumière fluorescente, afin de suivre des virus dans leur hôte (pour revue voir Joo *et al*, 2010). Bien que très performants, ces *quantum dots* nécessitent un couplage ou une encapsulation *in vitro* avant l'introduction des particules ainsi marquées dans les cellules. De ce fait, ils permettent essentiellement de suivre le virus dans les toutes premières étapes du cycle viral comme l'entrée du virus ou le transport intracellulaire, mais pas dans les étapes ultérieures. Toutes ces nouvelles approches constituent des technologies de pointe qui nécessitent encore une expertise particulière et dont l'accès reste réservé à un petit nombre d'équipes multidisciplinaires expérimentées.

En revanche, la découverte de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) et le développement de protéines fluorescentes additionnelles ont révolutionné la virologie en permettant une généralisation du marquage des protéines et des ARN viraux (Baulcombe *et al*, 1995; Tilsner & Oparka, 2010; Tilsner, 2015). Initialement utilisée pour suivre une infection virale de façon globale, l'introduction dans le génome viral d'une séquence codant pour une protéine fluorescente a rapidement évolué dans le but de suivre chacune des protéines virales (Oparka *et al*, 1997) pour visualiser leur localisation subcellulaire et mieux comprendre leur rôle au cours du cycle viral. Grâce à l'utilisation combinée de la fusion des gènes

viraux et du marquage des compartiments et des structures cellulaires, cette approche a permis d'aborder diverses questions de virologie (Brandizzi *et al*, 2002). Ainsi la protéine 6K₂ du *Turnip mosaic virus* (TuMV), fusionnée aux protéines fluorescentes GFP ou mCherry, a montré au cours de l'infection virale le mouvement, de cellule à cellule, de vésicules contenant la protéine de fusion, la polymérase virale et de l'ARN double brin (Grangeon *et al*, 2013; Agbeci *et al*, 2013), suggérant que les complexes de réplication des potyvirus pourraient constituer l'entité qui assure le mouvement intercellulaire de ces virus. L'utilisation de protéines fluorescentes permet aussi d'aborder des questions concernant la réplication, comme c'est le cas dans une étude qui a montré que la réplication du *Tobacco mosaic virus* (TMV) était inhibée par un signal émanant des méristèmes des racines latérales (Valentine *et al*, 2002), ou d'évaluer voire de réévaluer la distribution spatiale de populations virales dans un hôte (Dietrich, 2003; Takahashi *et al*, 2007). Des *N. benthamiana* qui expriment la GFP dans le réticulum endoplasmique (lignée 16c) ont récemment montré que les protéines riches en cystéines du *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) et du *Tobacco rattle virus* (TRV) suppriment le *silencing* plus efficacement dans les racines que dans les feuilles (Andika *et al*, 2012).

La capacité à marquer des capsides virales aussi bien flexueuses qu'icosaédriques peut également être cruciale dans la compréhension des mécanismes de transmission des phytovirus par leurs vecteurs, comme illustré dans les deux exemples suivants. En alimentant des aleurodes à travers un procédé expérimental constitué de membranes, il est possible de leur faire ingérer des virions purifiés du *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), des protéines recombinantes exprimées dans un système bactérien et des anticorps (Chen *et al*, 2011). Après dissection de la tête du vecteur, ce marquage a permis de corréler la rétention spécifique des particules flexueuses de ce crinivirus à une transmission efficace du virus et surtout de mettre en évidence le rôle essentiel de la protéine mineure de la capsid CPm dans ce processus. La fusion à la GFP du facteur assistant de la transmission du CaMV a également révélé la liaison indispensable des particules virales à un récepteur spécifique localisé dans une matrice de chitine à l'extrême pointe du stylet maxillaire des pucerons vecteurs dévoilant par là une nouvelle structure anatomique dénommée acrostyle (Uzest *et al*, 2007; Uzest, 2010; Uzest *et al*, 2010). Il y a peu, le marquage des particules virales via leur liaison à ce facteur assistant a montré que la transmission du CaMV par *Myzus persicae* se faisait par le biais de réservoirs de virions ou *transmission bodies* (Bak *et al*, 2013) qui sont rapidement réorganisés dans la cellule végétale lors de la piqûre du vecteur, pour favoriser l'ingestion du virus (Martinière *et al*, 2013).

1.2 Quelles solutions pour suivre le GFLV ?

En ce qui concerne le suivi et le marquage du GFLV, les outils disponibles à mon arrivée au laboratoire se composaient d'une collection restreinte d'anticorps dirigés contre la protéine structurale 2C^{CP} couramment utilisés en diagnostic ou dirigés contre quelques protéines non structurales (comme la protéine de mouvement 2B^{MP} et la protéine 1C^{VP8}) ainsi que de clones infectieux comportant des fusions avec la *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (Cormack *et al*, 1996) et la *Tag Red Fluorescent Protein* (TagRFP ou TRFP) (Merzlyak *et al*, 2007). Parmi ces clones viraux, seuls deux conservent leur capacité à provoquer l'infection systémique des plantes, il s'agit des constructions où les protéines fluorescentes (*fluorescent protein*, XFP) sont en position N-terminale de la protéine 1A ou C-terminale de la protéine 2A. La construction contenant la TRFP dans cette dernière position est particulièrement performante pour suivre l'infection [Figure 5.1] et a été utilisée notamment pour démontrer le rôle des *plasmodesmata located proteins* (PDLP) (Amari *et al*, 2010) et des myosines de classe XI (Amari *et al*,

2011) dans le mouvement de cellule à cellule du GFLV. La fusion 2A:XFP marque les compartiments viraux (Gaire *et al*, 1999) et, se maintenant après cinq passages successifs dans *N. benthamiana* ou *C. quinoa*, elle peut être considérée comme stable. La fusion XFP:1A, également compatible avec une infection systémique est moins stable génétiquement et nécessite une observation à plus fort grossissement.

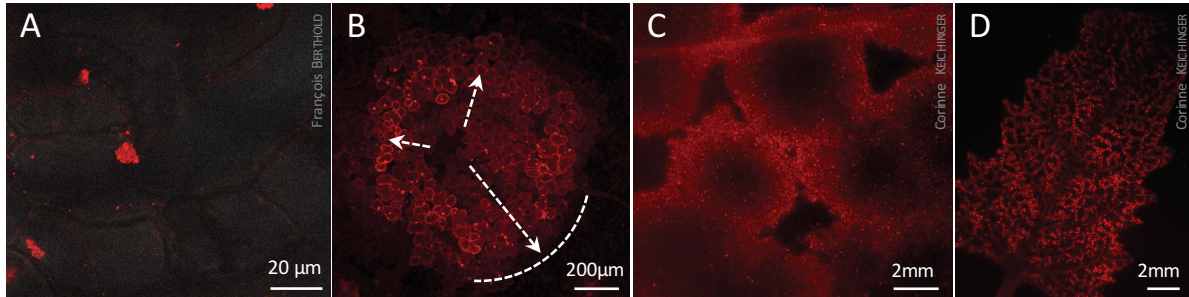


Figure 5.1 | Suivi de l'infection de plantes herbacées par le virus recombinant GFLV-2ATR exprimant la protéine 2A^{HP} en fusion avec la TagRFP.

A. Localisation subcellulaire de la 2ATR dans des complexes de répliquons dans *A. thaliana* (4 dpi). **B.** Visualisation d'un site d'infection sur feuille de *N. benthamiana* inoculée (4 dpi) : la fluorescence de la 2ATR montre la progression centrifuge de l'infection (flèches) dont le front est matérialisé par un arc de cercle en pointillés. **C.** En se développant, les sites d'infection deviennent confluents et atteignent les tissus vasculaires (10 dpi). Dans les cellules du centre la fluorescence s'éteint reflétant probablement un arrêt progressif de la réplication virale. **D.** Feuille de l'apex d'un *C. quinoa* infecté montrant la systémie de l'infection.

Une construction contenant une protéine fluorescente en amont de la 2B^{MP} s'est révélée non pertinente pour le suivi du virus en raison de la limitation de l'infection à une cellule unique. Cette limite a été surmontée par l'introduction de la séquence codante du peptide autocatalytique 2A du *Foot and mouth disease virus* (FMDV) puisque cette construction permet une infection systémique s'accompagnant d'une accumulation de protéines fluorescentes dans les feuilles non inoculées, cependant elle ne permet pas la visualisation de tubules fluorescents et n'est donc pas utilisable dans l'étude du mouvement du virus.

Aucune construction fusionnant une protéine fluorescente à la 2C^{CP} n'était disponible au laboratoire. Le marquage immunologique était donc jusque-là le seul moyen de détecter la 2C^{CP} ou des particules virales dans des cellules infectées (Ritzenthaler *et al*, 2002). Ce marquage, réalisé sur des échantillons fixés, ne permet cependant pas un suivi spatio-temporel des virions au cours du cycle viral et notamment au cours des étapes clés de mouvement de cellule à cellule et de transmission.

1.3 Quelles utilisations des Nanobodies en imagerie ?

Depuis la découverte des anticorps à chaînes lourdes de camélidés en 1993 (Hamers-Casterman *et al*, 1993), leurs domaines variables ont été rapidement clonés et utilisés dans le domaine animal et notamment pour l'imagerie et la thérapie des cancers. Ce secteur a bénéficié d'un recul considérable en la matière puisque beaucoup d'expériences avaient été réalisées auparavant avec des fragments scFv d'anticorps monoclonaux (Oliveira *et al*, 2013). Cependant l'utilisation de ces derniers avait abouti à des images irrégulières des tumeurs en raison de leur taille et donc de leur difficulté à pénétrer dans les tumeurs. Les Nb sont à la fois plus petits, plus stables et moins immunogènes que les scFv, ils sont distribués rapidement, se fixent à leur cible avec une forte affinité et sont rapidement éliminés lorsqu'ils ne sont pas liés, produisant un bon contraste, que ce soit en imagerie nucléaire (lorsque le Nb est couplé à un radio-isotope comme le ⁸⁹Zr ou le ⁶⁸Ga) ou en imagerie optique (lorsque le Nb est couplé à un

fluorochrome émettant dans l'infra-rouge) (Chakravarty *et al*, 2014). De nombreux Nb sont utilisés actuellement à titre expérimental pour visualiser des xénogreffes de tumeurs humaines dans des souris (Oliveira *et al*, 2013) et quelques-uns, comme un Nb spécifique d'un marqueur du cancer du sein (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2), ont montré leur utilité dans le marquage *in vivo*, chez des patients (Romer *et al*, 2011). Des Cb sont également en cours de développement pour visualiser différents compartiments et paramètres cellulaires grâce à l'obtention de lignées cellulaires stables. Ainsi des cellules exprimant un Cb dirigé contre la lamine ont permis d'imager la dégradation de la lamina nucléaire caractéristique de l'apoptose (Romer *et al*, 2011).

L'obtention de poissons-zèbres transgéniques exprimant des Cb anti-F-actine et anti-PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) a démontré l'immense potentiel des Cb dans des organismes entiers, y compris des vertébrés, pour le suivi de protéines endogènes dans différents types cellulaires et à différents stades de développement (Panza *et al*, 2015). Contrairement aux protéines de fusion utilisées jusqu'à présent, les Cb permettent de visualiser des protéines cellulaires exprimées dans leur contexte d'origine et à leur niveau d'expression naturel, à travers les différentes phases du cycle cellulaire.

Plus récemment la combinaison de la technologie Nanobody et *quantum dot* a permis la visualisation de virions du FMDV dans des cellules de rein de hamster (*baby hamster kidney cells*, BHK-21) (Di Wang *et al*, 2015). De même, l'utilisation combinée de cellules Hela-Kyoto exprimant de façon stable un Cb dirigé contre le domaine CA (protéine de capsid) de la polyprotéine Gag du HIV-1 et de la microscopie super-résolutive a permis une visualisation directe et dynamique des sites d'assemblage des virions et a révélé l'existence d'états organisationnels différents de la polyprotéine Gag au cours de la morphogénèse du virus (Helma *et al*, 2011).

Les exemples d'utilisation de Cb en plante sont bien plus limités. Après une première vérification de l'efficacité d'un Nb à reconnaître son antigène en plante (Schornack *et al*, 2009), des Cb ont été utilisés dans une étude comparant la dynamique du cytosquelette d'actine selon que le marquage a été réalisé à l'aide d'une protéine de liaison à l'actine fusionnée à la GFP ou à l'aide d'un Cb constitué d'un Nb anti-actine fusionné à la *Yellow fluorescent protein* (YFP) (Rocchetti *et al*, 2014). Ces expériences ont montré que le marquage de l'actine par le Cb ralentit un peu plus le mouvement des organelles le long des filaments d'actine que le marquage par protéine de liaison mais en conserve mieux la complexité (déplacements saltatoires). C'est dans ce contexte novateur de l'utilisation de Cb en plantes que s'est inscrite l'expérimentation des Cb anti-GFLV pour le suivi du virus.

2 Utilisation des Nanobodies pour suivre le GFLV

2.1 In planta

Les plantes transgéniques exprimant le Nb:23EGFP présentent l'avantage d'une expression généralement homogène dans l'ensemble des tissus de la plante (racines, feuilles, fleurs...) à différents stades de développement et non pas seulement dans des feuilles infiltrables. Le GFLV-F13, -GHu ou -2ATR ont été inoculés à des plantes de différentes lignées 23EG de la génération T1 qui ont été observées par microscopie confocale lorsqu'elles développaient une infection. Présentant une localisation nucléo-cytoplasmique diffuse dans les plantes saines et les zones non infectées des plantes inoculées, les Cb sont relocalisés en agrégats cytoplasmiques accompagnés de structures ponctuées nucléaires dans les zones infectées [Figure 5.2]. Étant donné la forte résistance des plantes de la lignée 23EG16-9 et 23EG38-4 vis-à-vis du GFLV (Cf Chapitre 4.2 : Résistance au GFLV induite par l'expression

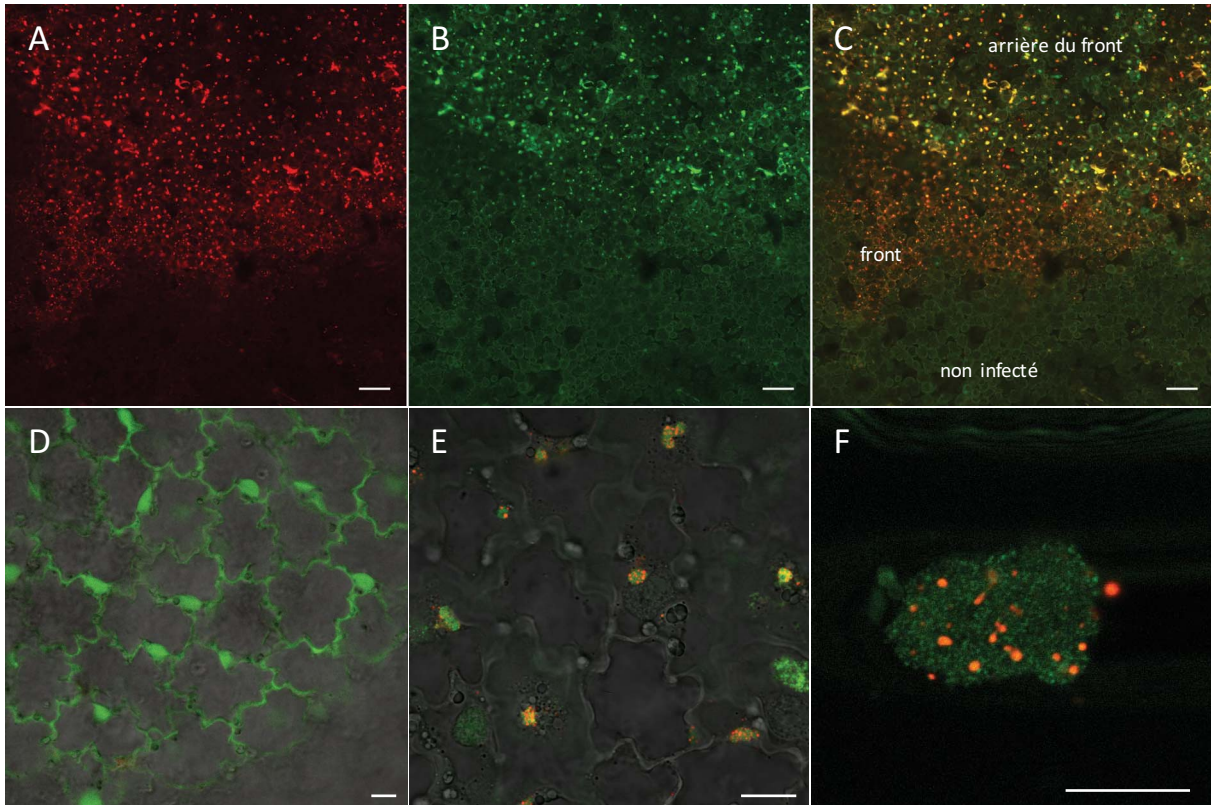


Figure 5.2 | Relocalisation du Nb:23EGFP lors de l'infection par le GFLV-2ATR.

A, B, C. Bordure d'un site d'infection 6 jours après inoculation de GFLV-2ATR dans un *N. benthamiana* de la lignée T1 23EG34. Dans les cellules infectées mises en évidence par l'expression de la protéine de fusion 2ATR (signal rouge, A), le Nb23:EGFP (signal vert, B) est relocalisé en agrégats. À l'avant du front, dans les cellules non infectées, le Cb présente une localisation nucléo-cytoplasmique diffuse. C correspond à la superposition de A et B. **D.** Zone non infectée d'un pétale d'une plante de la lignée T1 23EG16. **E.** Zone infectée d'un pétale de la même plante montrant que les cellules infectées par le GFLV-2ATR présentent une relocalisation du Cb au niveau des compartiments viraux. **F.** Agrandissement d'un compartiment viral de structure granuleuse caractéristique reflétant le Cb probablement complexé à des particules virales (signal vert) et dans lequel la protéine 2ATR forme de petits amas ponctuels, sites probables de synthèse de l'ARN2. Barres d'échelle : 100 μm (A-C) et 10 μm (D-F).

de Nanobodies), il faut envisager que la plupart des infections obtenues puissent être le résultat d'un contournement de la résistance par des variants du GFLV. La relocalisation des Cb est visible à faible grossissement (environ 100x) et permet de distinguer aisément les zones infectées des zones indemnes de virus et à plus fort grossissement, les images obtenues montrent la localisation subcellulaire des agrégats Cb/GFLV. Les complexes immuns Cb/antigène apparaissent ainsi situés dans le compartiment viral qui est visualisé grâce à la fusion 2A:TRFP [Figure 5.2 | B, C, D ; Figure 5.3], confirmant les résultats déjà observés par marquage de protoplastes de tabac BY2 infectés, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti GFLV (Ritzenthaler et al, 2002) [Figure 5.3 | A]. Une relocalisation des Cb est également bien visible dans le noyau des cellules infectées [Figure 5.3 | F, G], en adéquation avec les images de microscopie électronique publiées montrant des particules virales de GFLV dans le noyau de cellules de *C. quinoa* infectées (Savino et al, 1985; Ritzenthaler et al, 2002) [Figure 5.3 | E]. De même, un alignement fluorescent de Cb est parfois observé dans le cytoplasme des cellules infectées de *N. benthamiana* exprimant le Nb23:EGFP [Figure 5.3 | I, J, L], représentant très certainement les agrégats para-cristallins de virions, associés à des structures de type fibrillaire déjà documentés dans des études menées par

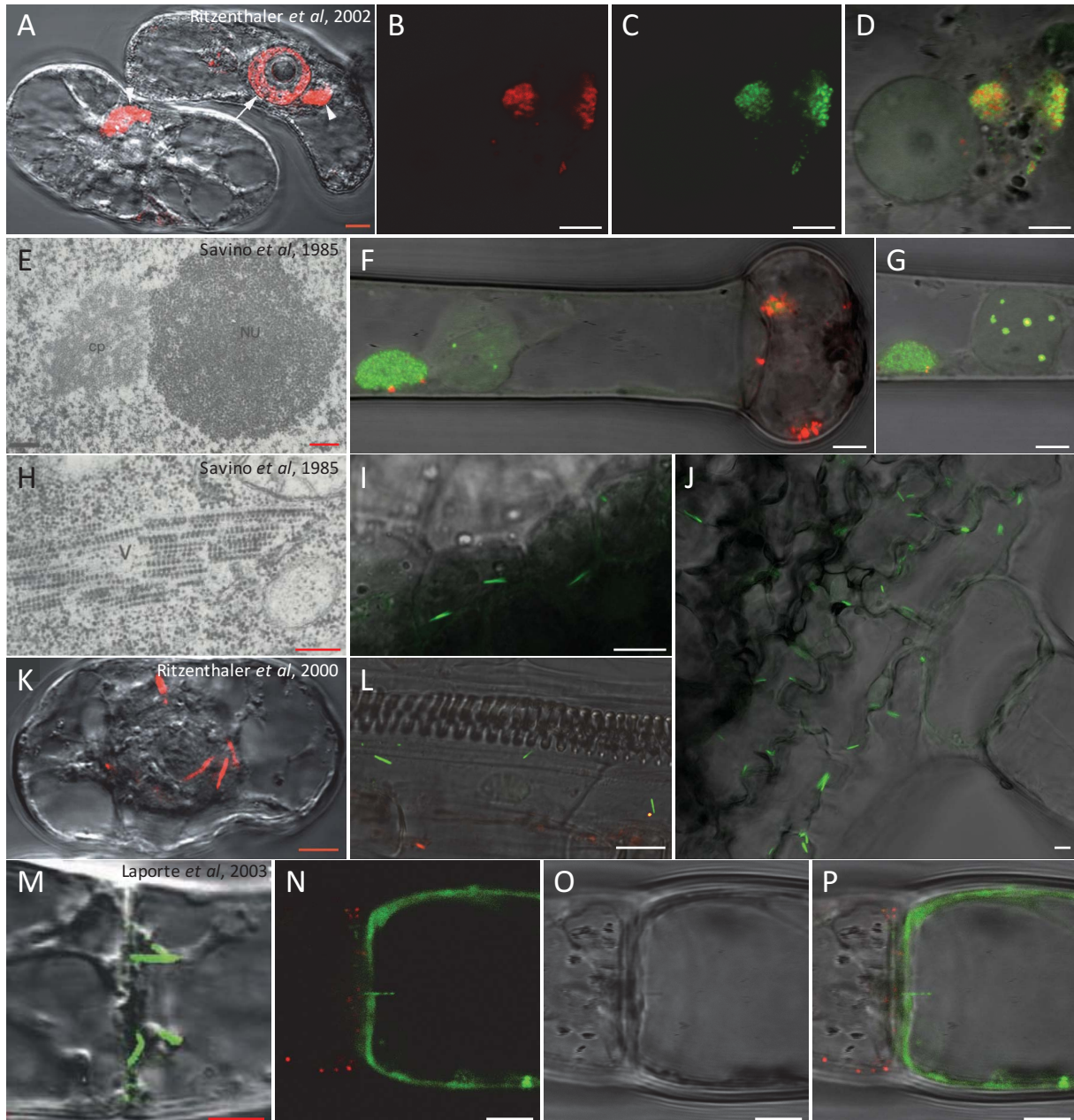


Figure 5.3 | Le Nb23:EGFP met en évidence toutes les structures cellulaires connues du GFLV.

A. Protoplastes de BY2 fixés et marqués avec un anticorps anti-CP couplé Alexa 568 montrant la CP dans les compartiments viraux périnucléaires (têtes de flèches) et dans le nucléoplasme (flèche). **B, C, D.** Dans une plante de la lignée transgénique T1 23EG12 infectée par le GFLV-2ATR, on observe les mêmes compartiments viraux périnucléaires où se concentrent la 2ATR (B) et le Nb23EGFP (C). D est la superposition de B et C et du même champ en lumière transmise. **E, F, G.** Comme décrit dans la littérature (E), on observe également un marquage de la CP par le Nb23:EGFP dans le noyau (F et G). F et G correspondent au même trichome observé dans des plans optiques différents. On note très nettement la présence de structures ponctués fluorescents dans le nucléoplasme. **H, K.** Exemples d'arrangements paracristallins observés dans le cytoplasme de cellules de *C. quinoa* (G) ou de protoplastes de BY2 marqués avec un anticorps anti-CP couplé Alexa 568 (K). **I, J, L.** On observe des alignements fluorescents similaires avec le Nb23EGFP dans une racine (L) ou un sépale (J) de la lignée T2 23EG16-7 infectée par le GFLV-2ATR ou un sépale de la lignée T2 23EG16-9 infecté par le GFLV-CP+3 (I). **M.** Visualisation de tubules par expression de $2B^{MP}$ fusionnée à la EGFP dans des cellules de BY2 (Laporte *et al*, 2003). **N, O, P.** Trichome de *N. benthamiana* de la lignée T1 23EG16 infectée par le GFLV-2ATR montrant un marquage par le Nb23EGFP ressemblant à un tubule permettant le passage de particules de la cellule de gauche à la cellule de droite suggérant la compatibilité de l'activité biosensing du Cb avec les tubules formés par le GFLV. P correspond à la superposition de N et O. N correspond à la superposition des canaux d'acquisition de la fluorescence de la protéine 2ATR et du Nb23:EGFP et O au même champ en lumière transmise. Barres d'échelle : 5 μ m excepté D et G 200 nm.

microscopie électronique et par immunomarquage en microscopie optique (Savino et al, 1985; Ritzenthaler et al, 2002) [Figure 5.3 | H, K]. De façon bien plus exceptionnelle et remarquable, des structures allongées émanant de la paroi cellulaire ont également été observées [Figure 5.3 | N-P]. Ces structures, bien que l'immuno-marquage avec un anticorps anti-2BMP n'ait pas pu être réalisé pour le confirmer, sont tout à fait compatibles avec des tubules remplis de particules virales observés en microscopie électronique et sont conformes aux tubules fluorescents visualisés par microscopie confocale dans des cellules transgéniques exprimant la protéine de fusion EGFP:2BMP (Laporte et al, 2003) [Figure 5.3 | M]. Ainsi, la relocalisation des Cb, lors d'une infection virale, récapitule l'ensemble des localisations des particules virales de GFLV dans des cellules infectées, déjà décrites, validant l'utilisation de ces plantes transgéniques pour le suivi du virus.

L'infiltration de ces plantes avec des agro-bactéries permettant l'expression transitoire de la $2C^{CP}$, dont on sait qu'elle conduit à la formation de *virus-like particles* (VLP) (Gottschamel, 2008), a résulté en une relocalisation des Cb à la fois dans le cytoplasme et, sous forme ponctuelle, dans le noyau [Figure 5.4], de façon tout à fait semblable à ce qui a été observé lors d'une infection virale. Ce constat démontre que cette translocation de $2C^{CP}$ et très probablement, à l'image d'observations précédentes (Savino et al, 1985), la formation de capsides vides dans le noyau sont liées aux propriétés intrinsèques de la $2C^{CP}$ et ne sont pas dépendantes de l'infection virale proprement dite. À ce jour, ni la pertinence ni le mécanisme de cette accumulation nucléaire de CP ne sont connus, mais les plantes transgéniques exprimant les Cb constituent un outil qui permettra d'étudier ce phénomène de façon dynamique.

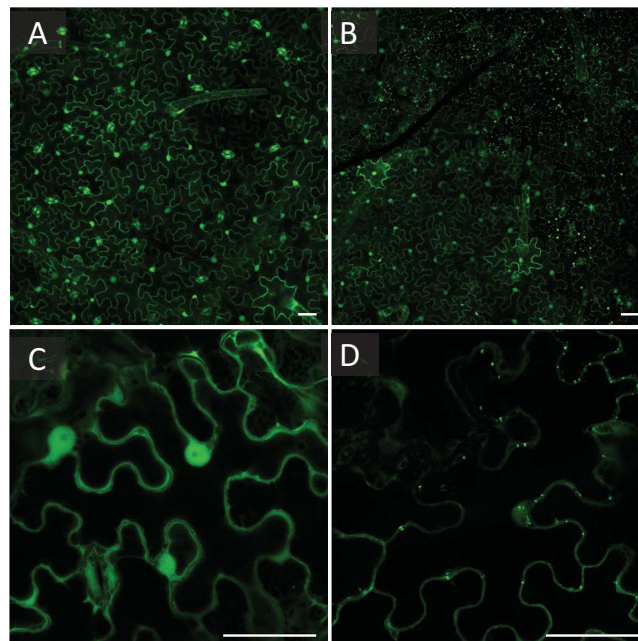


Figure 5.4 | Relocalisation du Nb23:EGFP lors de l'expression transitoire de $2C^{CP}$ dans des plantes 23EG16-9
La protéine $2C^{CP}$ exprimée transitoirement par agroinfiltration ($A_{595\text{ nm}} = 0,1$) n'affecte pas la localisation nucléocytoplasmique de la EGFP dans des plantes transgéniques de la lignée T2 EG11-3 (A et C), mais provoque la relocalisation du Cb en structures ponctuelles réparties dans le cytoplasme et dans le noyau dans des plantes de la lignée 23EG16-9 (B et D). Barres d'échelle : 50µm

Bien que les plantes de la lignée 23EG16-9, en raison de la résistance qu'elles confèrent, ne puissent pas être considérées comme des plantes adaptées au *biosensing* du virus, elles ont permis l'émergence du mutant GFLV-CP+3, capable de les infecter à 100 %, mais qui est toujours reconnu *in vivo* par le Cb. Cette combinaison de plantes 23EG16-9 et du virus GFLV-CP+3 constitue donc un outil de choix pour le

suivi du virus *in planta*. Lors d'expériences préliminaires où des plantes 23EG16-9 ont été infectées par le GFLV-CP+3, les mêmes feuilles inoculées et premières feuilles systémiques, présentant la transition puits/source, ont été observées plusieurs jours de suite. Ces observations ont montré une localisation du Cb ponctuelle et répartie dans toute la cellule en tout début d'infection, suivie d'une concentration de la fluorescence dans la zone périnucléaire du compartiment viral et enfin un marquage limité à quelques points dans le noyau en fin d'infection [Figure 5.5]. Ce premier suivi dynamique du comportement de la

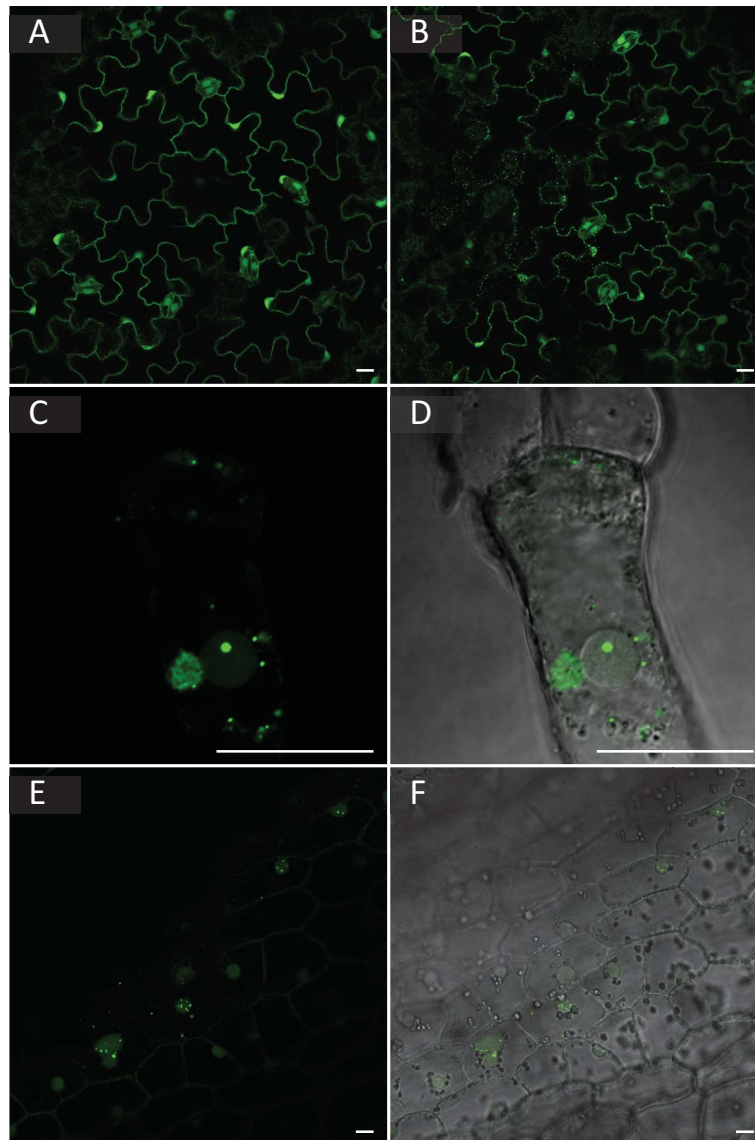


Figure 5.5 | Les variants contournant la résistance sont reconnus *in vivo* par le Nb23:EGFP.

Le suivi de l'infection par microscopie confocale de plantes de la lignée T2 23EG16-9 infectées par un passage d'un contournant non caractérisé de GFLV-GHu (A à D) ou d'un passage de GFLV-CP+3 (E, F) a conduit à des observations similaires. Au début de l'infection, dès l'apparition des symptômes sur la première feuille systémique qui subit la transition puits/source, le Cb passe d'une localisation nucléo-cytoplasmique diffuse (A), dans une zone asymptomatique de la feuille, à une relocalisation en de nombreux points répartis dans les cellules dans une zone symptomatique (B). Un agrandissement d'une cellule de trichome infectée issu de la même feuille (C, D) montre qu'au cours de la progression de l'infection le Cb est relocalisé dans le compartiment viral périnucléaire et dans des ponctuations nucléaires. En fin d'infection, la relocalisation est plus difficile à observer et ne se voit que dans quelques tissus apicaux comme les pétales et est majoritairement limitée à des points dans le noyau (E, F). A et B sont observés à 8 dpi, C et D à 11 dpi et E et F à 34 dpi. Barres d'échelle : 20μm

CP et/ou de la capsid du GFLV peut être comparé à la relocalisation de la 2A:GFP qui semble cibler la polyprotéine P2 et/ou l'ARN2 depuis des sites épars dans la cellule jusqu'au complexe de réplication (Gaire *et al*, 1999), ce qui lui a valu la qualification de *homing protein* (Ritzenthaler *et al*, 2002). Ce suivi de l'infection précoce devra être répété avec la construction GFLV-2ATR-CP+3, déjà disponible, afin de comparer au fil du temps le comportement de la protéine non structurale 2A et de la protéine structurale 2C^{CP}, toutes deux issues du clivage protéolytique de la P2. Outre ce suivi au cours du temps, d'autres observations ont été réalisées sur la plante entière qui montrent des relocalisations du Cb aussi bien sur la feuille inoculée, où l'on peut suivre les sites d'infection en croissance, que sur la première feuille systémique, sur les suivantes, sur les fleurs et sur les racines. Ces observations, réalisées à la toute fin de ma thèse, devront être répétées et pourront être approfondies avec l'étude d'étapes jusque-là impossibles à observer parce qu'elles impliquent vraisemblablement avant tout les protéines structurales. Parmi ces étapes on peut citer le mouvement du virus à courte et longue distance et notamment le chargement des particules virales dans le phloème des feuilles inoculées et leur déchargement dans les feuilles systémiques et peut-être, si le complexe formé par le Cb et le virus est stable et n'empêche pas la reconnaissance de la capsid par le récepteur, la rétention des virions dans le nématode vecteur.

Parallèlement aux premières utilisations du variant GFLV-CP+3 pour le suivi du virus, l'émergence de variants présentant des extensions de la CP ont fait naître l'hypothèse qu'une fusion de la CP à une protéine fluorescente n'est sans doute pas aussi délétère qu'initialement présumé en raison d'un probable encombrement stérique. La construction GFLV-CPTR codant pour la fusion 2C^{CP}:TRFP a donc été obtenue par Corinne KEICHINGER et a été récemment testée sur *N. benthamiana*. Les premiers résultats montrent que de nombreux sites d'infection sont visibles sur la feuille inoculée et qu'ils s'allongent même à proximité des tissus vasculaires [Figure 5.6]. Cependant aucune infection systémique n'a encore été observée, suggérant que cette fusion empêche le mouvement à longue distance sans empêcher le mouvement à courte distance ou que cette fusion ralentit suffisamment la progression du virus pour que la plante ait le temps de mettre en place des réactions de défense efficaces contre le virus. La conjonction de ce nouveau clone infectieux et des Cb élargit l'éventail des outils maintenant disponibles pour le suivi du virus et devrait permettre la mise en évidence de phénomènes difficiles à imager par seulement l'un ou l'autre de ces moyens.

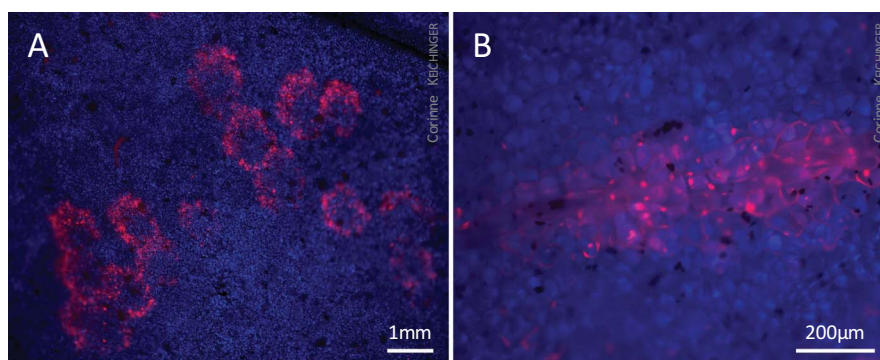


Figure 5.6 | Le GFLV-CPTR est compétent pour former des sites d'infection dans *C. quinoa*.

A. De nombreux sites d'infection sont visibles 17 jours après l'inoculation de transcrits de la construction GFLV-CPTR. **B.** À proximité des nervures, les sites présentent une forme allongée (9 dpi). En bleu l'autofluorescence de la chlorophylle montre l'absence de lésions mécaniques.

Par ailleurs, les différents Cb spécifiques du GFLV, bien que tous relocalisés par le virus et marquant les mêmes structures lorsqu'ils sont utilisés concomitamment [Figure 5.7], ne semblent pas pour autant pleinement interchangeables, mais apparaissent plutôt complémentaires. En effet, des plantes

transgéniques élaborées par Kamal HLEIBIEH à partir des Nb122:TRFP et Nbp59:TRFP, qui permettent également un *biosensing* efficace du GFLV (cf Conclusions et perspectives), n'ont jusque-là pas conduit à la visualisation *in vivo* des alignements fluorescents parfois observés dans les plantes des lignées 23EG [Figure 5.3]. Ces mêmes Cb utilisés en immunomarquage sur des protoplastes de *N. benthamiana* sauvages infectés et fixés décorent pourtant ces mêmes structures virales para-cristallines de fonction inconnue suggérant une éventuelle interférence de certains Nb avec leur formation. Posséder des lignées différentes présentant des comportements différents offre une panoplie d'outils variés pour une étude dynamique du cycle viral du GFLV.

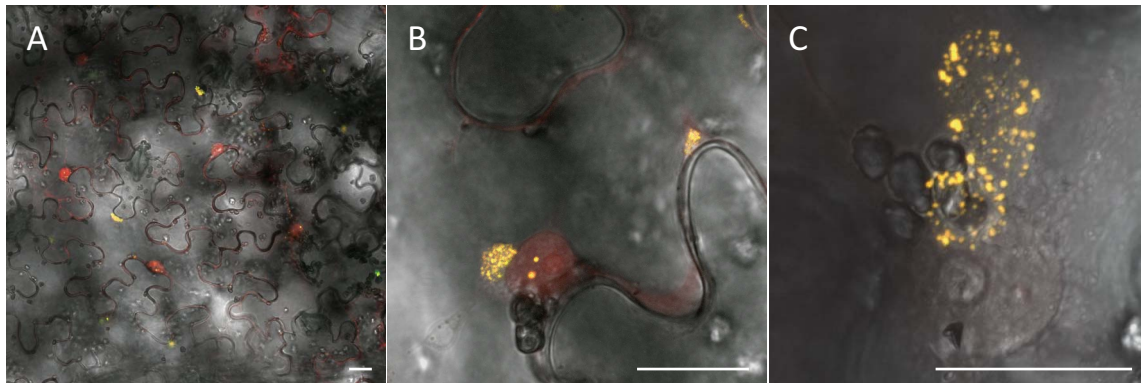


Figure 5.7 | Le variant GFLV-CP+3 est reconnu *in vivo* par les Nb23:EGFP et Nb122:TRFP.

Des plantes transgéniques de la lignée 23EG16-9 infectées par du virus synthétique GFLV-CP+3 et agro-infiltrées ($A_{595nm}=0,4$) avec une construction permettant l'expression du Nb122:TRFP (pEAQΔ3-Nb122:TRFP) montrent que les deux Cb colocalisent, preuve qu'ils reconnaissent ce variant *in vivo* (A). À plus fort grossissement (B, C), on voit que les deux Cb reconnaissent les mêmes éléments dans ce qui s'apparente aux compartiments viraux. A, B et C correspondent à la superposition du signal de fluorescence vert (Nb23:EGFP), du signal rouge (Nb122:TRFP) et du contraste interférentiel différentiel (DIC). Barres d'échelle : 20 μ m

Enfin, l'obtention par Baptiste MONSION de Nb dirigés contre l'ArMV devrait rapidement mener à la production de plantes transgéniques pour le suivi de ce virus proche du GFLV et ainsi peut-être confirmer l'incurvation caractéristique des structures para-cristallines de l'ArMV (Savino *et al*, 1985). L'ensemble de ces outils de marquage du virus *in vivo* ouvre la voie à l'étude dynamique du rôle possible de ces structures para-cristallines dans la transmission du virus. Une redistribution du virus lors de l'alimentation du nématode pour favoriser l'ingestion du virus par son vecteur est effectivement envisageable à la manière des *transmission bodies* décrits pour le CaMV qui sont redéployés le long des microtubules suite à la piqûre de la cellule par le puceron vecteur (Martinière *et al*, 2013).

2.2 Ex vivo

L'étude de la transmission du GFLV par son vecteur a également bénéficié de la purification des Cb produits en bactéries pour une utilisation en immunomarquage sur des coupes de nématodes. Ce travail mené par Aurélie MARMONIER et pour lequel j'ai effectué une partie des observations, a consisté à réaliser des immunomarcages sur les parties antérieures isolées de *X. index* virulifères à l'aide du Nbp59:TRFP purifié. Environ 40 % de ces parties de nématodes observés ensuite par microscopie confocale ont présenté un marquage du canal alimentaire sur l'ensemble des zones précédemment décrites comme retenant les particules virales (odontophore, œsophage et bulbe œsophagien) (Taylor & Robertson, 1970), avec un marquage notable de la lumière triradiée du bulbe œsophagien et un arrêt net du marquage à la jonction entre l'odontophore et l'odontostyle [Figure 5.8]. Bien que des expériences de ce type aient été rapportées précédemment dans la littérature avec des anticorps polyclonaux spécifiques du

Tobacco ringspot virus (TRSV) sur des fragments de *X. americanum* (Wang *et al*, 2002), un marquage du GFLV dans son vecteur n'avait jamais été obtenu avec des anticorps conventionnels, malgré plusieurs tentatives. Ces analyses immunologiques devraient contribuer à élucider la nature biochimique du récepteur assurant la rétention du virus dans son vecteur, comme cela a été fait pour le CaMV (Uzest *et al*, 2007), et peut-être même conduire à terme à l'identification de ce récepteur.

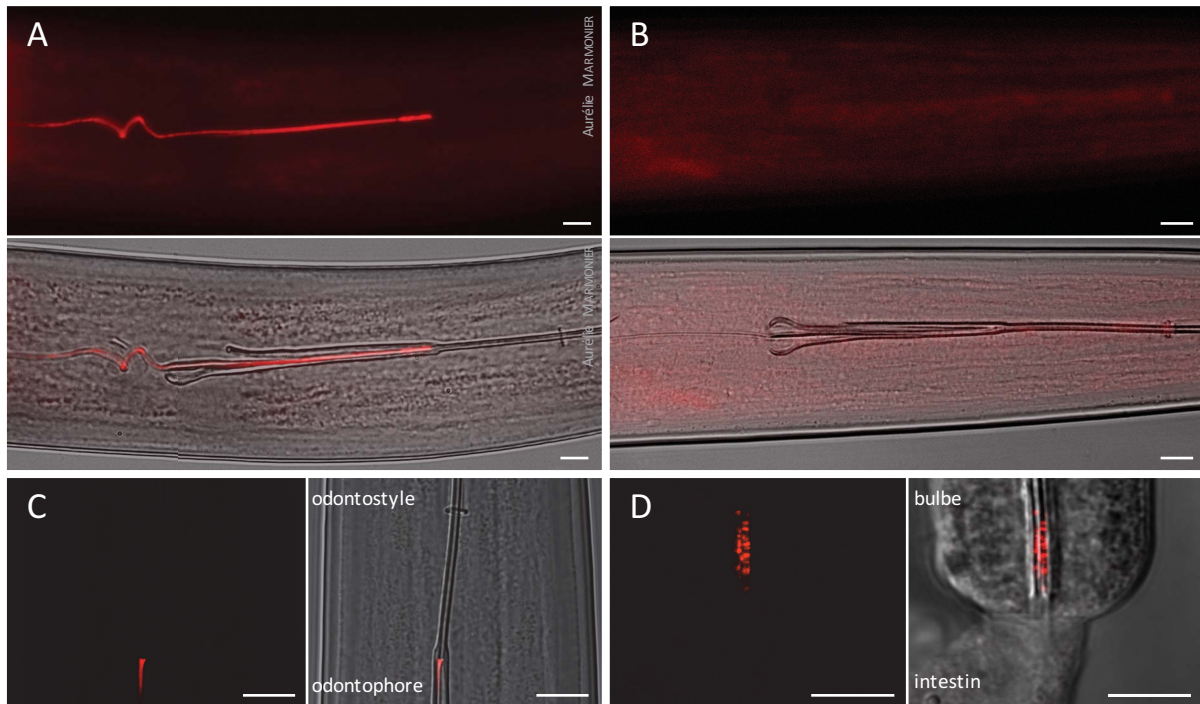


Figure 5.8 | Immunomarkage à l'aide du Nbp59:TRFP des sites de rétention du GFLV-F13 dans *X. index*.

Des *X. index* porteurs du GFLV-F13 ont été isolés d'élevages conduits en conditions contrôlées en serre puis fixés au paraformaldéhyde. Les parties antérieures, séparées au scalpel, ont été observées par microscopie à épifluorescence ou par microscopie confocale après blocage, perméabilisation et incubation avec le Nbp59:TRFP. Le Cb décore spécifiquement le canal alimentaire de nématodes virulifères (A) tandis qu'aucun marquage aspécifique n'est observé dans des nématodes avirulifères (B). L'odontophore est marqué par le Cb, mais pas l'odontostyle (C), la lumière triradiée du bulbe œsophagien (D) est marquée, en accord avec les résultats antérieurs (Taylor & Roberston, 1970). Pour chaque panneau une image de fluorescence et une image superposant la fluorescence et le contraste interférentiel différentiel (DIC) est montrée. Barres d'échelle : 10 μm .

L'utilisation des Cb pour marquer le virus dans le nématode ouvre en effet la voie à un test *ex vivo* qui pourrait consister à incuber du jus de plantes infectées (ou agro-infiltrées) sur des coupes de nématodes puis à marquer les particules éventuellement retenues dans le canal alimentaire du vecteur. Différents mutants dans la 2C^{CP} pourraient alors être testés pour identifier les résidus responsables de la rétention spécifique de la capsidie dans le nématode. Dans le même ordre d'idées, ce nouvel outil permettra aussi de répondre à la question, pas encore totalement tranchée, de la seule implication de la 2C^{CP}, ou de l'implication de protéines virales additionnelles, dans l'acquisition et la rétention des particules virales par le vecteur. On pourra par exemple générer des plantes transgéniques exprimant la 2C^{CP} et alimenter le nématode sur leurs racines, susceptibles d'accumuler des VLP, puis facilement vérifier la potentielle rétention de ces VLP dans l'appareil alimentaire des nématodes.

Conclusions et perspectives

Les propriétés biophysiques, structurales et fonctionnelles remarquables des Nb alliant taille réduite, haute stabilité, structure monomérique et capacités de reconnaissance uniques en font une classe de molécules extrêmement utiles et largement utilisées pour la recherche, le diagnostic ou encore la thérapie humaine et animale. Depuis que le premier article décrivant la découverte d'anticorps à chaînes lourdes chez les camélidés (Hamers-Casterman *et al*, 1993) a été publié, il y a un peu plus de vingt ans, le nombre de publications concernant les Nb est en constante progression et dépasse aujourd'hui 1300 articles référencés dans la base de donnée *Web of Science* de *Thompson Reuters* [Figure 6.1]. Ce nombre est impressionnant, mais lorsqu'on restreint le champ de recherche aux seules publications comportant le mot-clé "plante", il chute à 35, témoignant de l'exploitation encore très restreinte de la technologie Nanobody dans le domaine végétal. Mon travail de thèse démontre que les Nb, qui sont à la pointe des traitements innovants en santé humaine, peuvent pourtant également se révéler d'une grande valeur dans le domaine de la pathologie végétale.

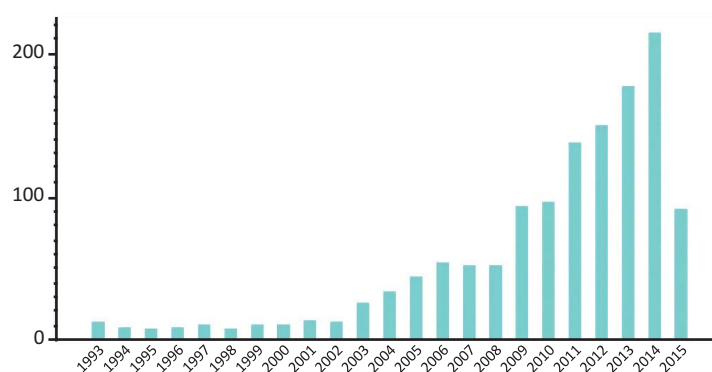


Figure 6.1 | Nombre de publications traitant des Nb entre 1993 et juillet 2015.

L'interrogation le 15 juillet 2015 de la base de données *Web of Science* avec le champ de recherche [nanobod* OR nanoantibod* OR "single-domain antibod*" OR "heavy-chain antibod*" OR "heavy chain-only antibod*" OR VHH OR sdAb OR "llama* antibod*" OR "camel* antibod*"] sur la période s'étendant de 1993 à nos jours a extrait 1324 publications ayant trait aux Nb. Ce nombre est en continuelle augmentation depuis les années 2000.

Dans l'idée initiale de développer un outil moléculaire pour étudier la spécificité de transmission du GFLV, une collection de 23 Nb spécifiques du GFLV, représentant une large diversité d'épitopes reconnus car appartenant à 11 familles différentes, a été produite (cf Chapitre 3 : Obtention d'une collection de Nanobodies reconnaissant le GFLV). L'expression en bactéries et la purification à homogénéité des deux-tiers d'entre eux a permis leur caractérisation *in vitro* vis-à-vis de trois variants du GFLV et a permis l'identification du Nb122, qui est discriminant entre le GFLV-F13 (transmis) et le GFLV-TD (faiblement transmis), traduisant une possible spécificité pour la région du virus reconnue par *X. index*.

Après fusion à une protéine fluorescente, l'expression constitutive du Nb23 dans *N. benthamiana*, a conduit à l'obtention de deux lignées homozygotes (23EG16-9 et 23EG38-4) qui sont résistantes au GFLV (cf Chapitre 4 : Les Nanobodies induisent de la résistance au GFLV). De façon remarquable, la

lignée 23EG16-9 est complètement immune à l'infection suite à l'inoculation mécanique de huit isolats naturels différents de GFLV ou d'ARN viraux, mais aussi suite à la mise en contact des racines avec des nématodes virulifères. La résistance est néanmoins surmontée à faible fréquence dans la lignée 23EG38-4 et, sous une forte pression d'inoculum, à une fréquence plus élevée dans les deux lignées. Ce contournement est directement lié à l'émergence de mutants du GFLV présentant des mutations de la CP au niveau de résidus exposés à la surface de la capsid, qui réduisent l'affinité du Nb23 pour le virus. De façon surprenante, la majorité des mutants identifiés comportent des acides aminés supplémentaires en fin de CP ce qui était considéré jusqu'à présent comme incompatible avec le maintien de l'infectivité virale en raison d'encombrements stériques nuisant à la formation d'une particule virale ou à son mouvement à travers les tubules et ouvre des perspectives nano-technologiques inattendues pour le GFLV. D'autre part, les mutations concernent toutes une seule région de la capsid située à proximité du site présumé d'interaction avec le nématode et dont l'implication dans la transmission n'avait jamais été démontrée. Pour au moins un mutant (GFLV-CP+3), le contournement de la résistance s'est produit au détriment de la transmissibilité par *X. index*. Par la pression de sélection exercée sur la CP, le Cb a donc contribué à une meilleure compréhension de la spécificité de transmission du GFLV en révélant l'importance d'une nouvelle région de la capsid du GFLV dans la spécificité de transmission. L'obtention par cryo-EM de la structure à haute résolution du GFLV-F13 complexé avec le Nb23 a précisé les points de contact du Nb23 avec la capsid du GFLV et montre, comme attendu, que l'épitope du Nb chevauche cette région confirmant ainsi l'ensemble des résultats biologiques obtenus.

Exprimés constitutivement dans *N. benthamiana*, les Cb se révèlent également être des *biosensors* efficaces qui rendent possible le suivi *in vivo* d'un virus sans avoir à fusionner une de ses protéines à une protéine fluorescente (cf Chapitre 5 : Les Nanobodies constituent des biocapteurs efficaces du GFLV). Lors de l'infection des plantes transgéniques, les Cb sont en effet relocalisés d'une répartition nucléocytoplasmique diffuse (en absence de virus) à un rassemblement en agrégats périnucléaires (en présence de virus) qui correspondent à la description des complexes de réplication formés par le GFLV lors de sa multiplication. Plus exceptionnellement, l'observation d'un marquage au niveau des jonctions intercellulaires de structures ressemblant aux tubules formés par le GFLV pour assurer son mouvement de cellule à cellule, suggère de plus que l'activité *biosensing* des Cb est compatible avec le passage des particules virales à travers ces tubules. Malgré des débuts difficiles, la résistance induite par le Nb23 et des événements de *silencing* du transgène ayant fortement compliqué les premières observations, l'identification du contournant GFLV-CP+3 et l'introduction de la mutation dans un clone viral synthétique a fourni avec la lignée stabilisée 23EG16-9 un système caractérisé et robuste pour étudier le devenir d'une infection virale dans tous les tissus d'un hôte.

L'exploration foisonnante du potentiel des Nb réalisée tout au long de ma thèse m'a non seulement donné la chance d'aborder de nombreux sujets de recherche différents, mais a également contribué au développement de nouveaux projets variés qui sont actuellement menés dans l'équipe "Bases moléculaires des interactions virus hôtes" (Christophe RITZENTHALER, IBMP, Strasbourg) et l'équipe "Virologie-Vection" (Olivier LEMAIRE, Inra, Colmar).

La capacité des Nb dirigés contre le GFLV à conférer de la résistance au virus a incité les différents partenaires institutionnels de ce projet (Inra, CNRS, Université de Strasbourg, IFV et VIB) à valoriser ces résultats par un dépôt de brevet (*Resistance to Grapevine fanleaf virus*, EP 14305100). Compte tenu du mécanisme mis en jeu, basé sur la reconnaissance d'un épitope viral par un anticorps, il est peu probable que la résistance induite dans la plante modèle *N. benthamiana* soit hôte-spécifique. Parvenir à

une expression satisfaisante du Nb dans la vigne pourrait en principe suffire à garantir l'obtention d'une résistance au GFLV dans son hôte naturel. Dans cet ordre d'idées, Samia DJENNANE (Inra, Colmar) a d'ores et déjà initié la transformation de vignes avec des constructions exprimant le Nb23:EGFP ou le Nb23 non fusionné. Les premiers résultats sont prometteurs, le Cb étant exprimé de façon homogène dans les feuilles de plantules de vigne régénérées [Figure 6.2]. Sous réserve d'une expression suffisante dans les tissus racinaires et de l'absence de phénomènes de *silencing* dans les vignes adultes, l'activité antivirale des Nb pourrait donc aboutir à l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre le court-noué au vignoble. Néanmoins, la vigne étant une plante pérenne, le contournement de la résistance est susceptible d'y avoir une incidence plus importante que celle observée jusque-là en plante herbacée. Cette hypothèse a conduit à l'obtention d'un financement par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) d'un projet visant à cumuler une approche Nb et une approche d'interférence par l'ARN pour induire dans la vigne une résistance au court-noué tout en limitant le risque d'apparition d'un contournement sur le long terme (COMBiNiNG, ANR-14-CE19-0022).



Figure 6.2 | Plantule de vigne en culture *in vitro* exprimant le Nb23:EGFP.

Les feuilles de plantules de vigne régénérées après transformation de cals avec des constructions permettant l'expression de Nb23:EGFP présentent une fluorescence verte homogène qui se superpose à l'autofluorescence rouge de la chlorophylle.

La démonstration de l'efficacité des Cb pour suivre le GFLV *in planta* a également ouvert la perspective de pouvoir porter un regard neuf sur la biologie du virus et permettre notamment l'étude des stades précoces de l'infection. A cet effet, dans le cadre d'un projet Interreg BACCHUS (réseau transfrontalier de recherche et de transfert de connaissances pour une viticulture durable) cofinancé par le fonds européen de développement régional, Kamal HLEIBIEH (IBMP, Strasbourg) a régénéré des *N. benthamiana*, exprimant constitutivement le Nbp59:TRFP (lignées p59TR) ou le Nb122:TRFP (lignées 122TR). L'absence de résistance vis-à-vis du GFLV-F13 et -GHu observée jusque-là dans les lignées T1 p59TR et l'absence de résistance vis-à-vis GFLV-GHu observée dans les lignées T1 122TR a permis d'élargir la panoplie disponible pour le *biosensing* du GFLV. Suite à l'infection de ces plantes transgéniques par le GFLV, ces Cb se sont en effet révélés performants pour le suivi du virus [Figure 6.3]. Le Nb122 ne partageant par ailleurs probablement pas le même épitope que le Nb23 (cf chapitre 4 : Les Nanobodies confèrent de la résistance au GFLV) les informations recueillies par ces trois systèmes de visualisation devraient s'avérer complémentaires pour assurer une étude détaillée du cycle viral du GFLV. De plus, des expériences de microscopie corrélative réalisées en collaboration avec Peggy ANDRET-LINK (Inra, Colmar) ont établi un lien direct entre les structures précédemment décrites par microscopie électronique lors d'une infection par le GFLV et la relocalisation des Cb visualisées en

microscopie à fluorescence. Au cours de son contrat post-doctoral, Kamal HLEIBIEH est également parvenu à élaborer un système d'observation en temps réel de l'alimentation de *X. diversicaudatum* sur *N. benthamiana* compatible avec la microscopie à fluorescence. La combinaison d'un tel système avec les plantes exprimant les Cb permettra prochainement de déchiffrer les phases d'acquisition et de transmission du virus par le nématode. Les Cb constituent ainsi des outils innovants qui seront décisifs pour parvenir à une meilleure compréhension de la dynamique intracellulaire du GFLV et de l'importance de ces processus pour le mouvement et la transmission du virus.

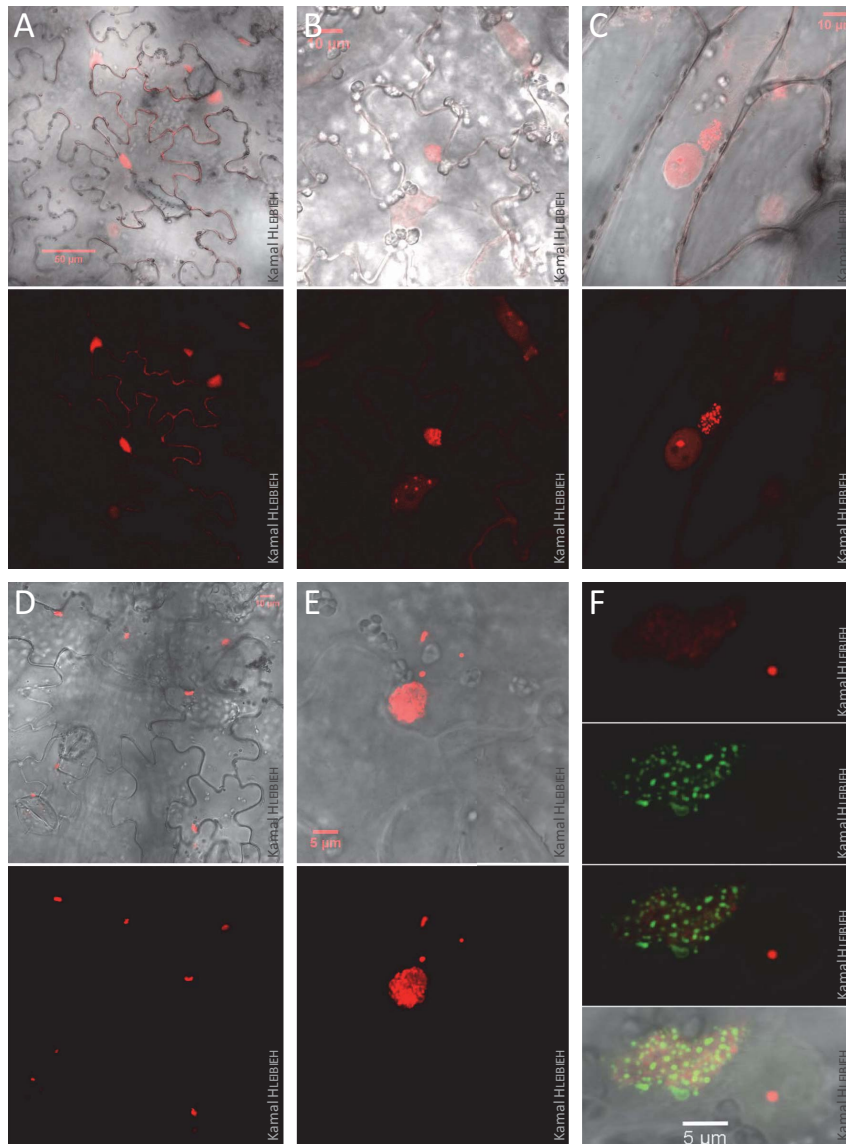


Figure 6.3 | Le Nb122:TRFP et le Nbp59:TRFP sont des biocapteurs efficaces du GFLV.

Exprimés constitutivement dans les lignées transgéniques T1, le Nb122:TRFP (A,B,C) adopte en l'absence de virus une localisation nucléocytoplasmique diffuse (A) tandis que le Nbp59:TRFP (D,E,F) apparaît sous forme d'agrégats cytoplasmiques (D). Lors de l'infection par le GFLV-GHu (B,E) ou -F13 (C), les Cb sont relocalisés au niveau d'agrégats cytoplasmiques périnucléaires et de points dans le noyau. Ces agrégats correspondent aux compartiments viraux visualisés en vert lors de l'infection par du GFLV recombinant exprimant la 2A:EGFP (F). Chaque panel montre une image de fluorescence et la même image superposée au DIC.

Utilisés dans la même optique d'étude de la transmission du GFLV, mais par immunomarquage, les Cb ont levé un verrou technologique qui freinait la recherche du récepteur du GFLV dans les nématodes. La première étape de la mise au point d'un test d'interaction *ex-vivo* dans *X. index*, a été validée par

Aurélie MARMONIER (Inra, Colmar) qui est parvenue via l'utilisation de Cb purifiés à détecter le virus dans des coupes de nématodes virulifères ce qui était jusque-là impossible par immunomarquage avec des anticorps classiques. Les réponses apportées par ces expériences, outre de satisfaire la curiosité scientifique sur une question fondamentale de virologie végétale qui reste encore en suspens, pourront également participer à la conception de nouvelles stratégies de lutte contre le court-noué de la vigne.

Enfin, ces travaux ont aussi permis de démontrer le potentiel des Nb dirigés contre le GFLV en tant qu'outil de diagnostic viral. Ce volet du projet est poursuivi par Léa ACKERER dans un travail de thèse financée par une bourse CIFRE de l'IFV. La caractérisation *in vitro* de toute la collection de Nb vis-à-vis de nombreux isolats du GFLV a ainsi conduit à l'identification de Nb possédant des propriétés de spécificité et de sensibilité intéressantes et a confirmé l'excellente performance des Nb en ELISA. Leur utilisation à des fins de diagnostic permettra de s'affranchir de la variabilité des lots d'anticorps polyclonaux classiques ou de la complexité de production, en termes d'expertise et d'infrastructure requises, des anticorps monoclonaux, et ce à des coûts drastiquement réduits comparativement à ceux des kits de détection actuellement commercialisés.

La validation de principe que les Nb spécifiques du GFLV constituent des outils polyvalents et évolutifs adaptés autant au diagnostic qu'à la lutte antivirale et à la recherche, a naturellement mené à l'idée que cette stratégie multi-usage peut être appliquée de la même façon à d'autres virus de plantes. Ce constat a conduit au développement d'un projet financé par l'ANR visant à mettre à profit cette technologie pour la lutte contre les principales maladies virales dévastant la viticulture (court-noué, enrroulement et bois strié) (VinoBodies, ANR-14-CE19-0018).

De nombreuses perspectives de recherche restent encore ouvertes pour tirer profit des opportunités apportées par les Nb. De façon immédiate, la question la plus brûlante est sans nul doute l'élucidation du mécanisme de résistance induit par le Nb23. Si les résultats expérimentaux ont rapidement expliqué le mécanisme de contournement, les analyses préliminaires n'ont pu que situer celui de la résistance en amont du mouvement de cellule à cellule sans arriver à en préciser sa nature. Il est probable qu'il soit complexe et qu'il implique l'inhibition simultanée de différentes étapes du cycle viral du GFLV

L'obtention récente de GFLV recombinant exprimant une CP fusionnée pourrait également élargir les possibilités de *biosensing* des Cb et fournir un outil complémentaire pour progresser dans la compréhension du mécanisme d'encapsidation du GFLV. En effet, les Nb reconnaissant préférentiellement des épitopes conformationnels, on peut imaginer qu'avec un Nb possédant un épitope à cheval sur plusieurs sous-unités, on puisse arriver à suivre différenciellement le transport intracellulaire de la CP et des particules et ainsi commencer à déchiffrer le processus d'assemblage du GFLV dont on ne connaît pas encore le site dans la cellule.

D'autre part, la diversité des résultats obtenus avec seulement une poignée de Nb dirigés contre le GFLV laisse entrevoir le potentiel encore important du reste de la collection. L'obtention récente de Nb spécifiques de l'ArMV permet d'envisager l'élargissement des différentes applications à ces deux agents du court-noué voire dans le futur à un éventail plus large de virus, notamment par l'utilisation de Nb bispécifiques ou de Nb à spécificité croisée.

Enfin, dans une perspective plus lointaine, on pourrait envisager de tirer profit de la technologie Nanobody dans la lutte contre le court-noué en dehors du contexte difficile de la transgénése. Les progrès dans le développement de vecteurs viraux adaptés à l'expression hétérologue de protéines dans les plantes ligneuses (Dawson & Folimonova, 2013) pourraient, en combinaison avec la fusion des Nb à

Conclusion

un système de dégradation cellulaire (protéasome, autophagie) (Causinus *et al*, 2011), aboutir à une solution curative à la maladie du court-noué.

Pour conclure, on peut parier que ce travail pionnier exploitant des Nb pour conférer de la résistance à un phytovirus et pour le suivi dynamique de ce virus *in vivo*, outre de proposer de nouvelles approches de lutte antivirale pour la filière viticole, ouvrira la voie à un usage généralisé des Nb en pathologie végétale. Nul doute que l'engouement pour ces derniers sera aussi prononcé et suscitera la même démarche d'innovation que dans le domaine animal.

Références bibliographiques

A

- Abawi GS & Widmer TL (2000) Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Appl Soil Ecol* **15**: 37–47
- Abe M, Yuki Y, Kurokawa S, Mejima M, Kuroda M, Park EJ, Scheller J, Nakanishi U & Kiyono H (2014) A rice-based soluble form of a murine TNF-specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Biotechnol* **175**: 45–52
- Abskharon RNN, Giachin G, Wohlkönig A, Soror SH, Pardon E, Legname G & Steyaert J (2014) Probing the N-terminal β -sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody. *J Am Chem Soc* **136**: 937–944
- Accord BR (1996) Asgrow Seed Co.; availability of determination of nonregulated status for a squash line genetically engineered for virus resistance
- Agbeci M, Grangeon R, Nelson RS, Zheng H & Laliberté J-F (2013) Contribution of Host Intracellular Transport Machineries to Intercellular Movement of Turnip Mosaic Virus. *PLoS Pathog* **9**: e1003683
- Agrawal V, Slivac I, Perret S, Bisson L, St-Laurent G, Murad Y, Zhang J, Durocher Y (2012) Stable expression of chimeric heavy chain antibodies in CHO cells. *Methods Mol Biol* **911**:287-303
- Albrecht D, Winterflood CM & Ewers H (2015) Dual color single particle tracking via nanobodies. *Methods Appli Fluoresc* **3**: 024001
- Amari K, Boutant E, Hofmann C, Schmitt-Keichinger C, Fernandez-Calvino L, Didier P, Lerich A, Mutterer J, Thomas CL, Heinlein M, Mély Y, Maule AJ & Ritzenthaler C (2010) A Family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**: e1001119
- Amari K, Lerich A, Schmitt-Keichinger C, Dolja VV & Ritzenthaler C (2011) Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog* **7**: e1002327
- Anderson GP, Goldman ER (2008) TNT detection using llama antibodies and a two-step competitive fluid array immunoassay. *J Immunol Methods* **339**: 47–54
- Anderson JM, Palukaitis P & Zaitlin M (1992) A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8759–8763
- Andika IB, Kondo H, Nishiguchi M & Tamada T (2012) The cysteine-rich proteins of beet necrotic yellow vein virus and tobacco rattle virus contribute to efficient suppression of silencing in roots. *J Gen Virol* **93**: 1841–1850
- Andret-Link P, Laporte C, Valat L, Ritzenthaler C, Demangeat G, Vigne E, Laval V, Pfeiffer P, Stussi-Garaud C & 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
- Aragão FJ, Nogueira EO, Tinoco MLP & Faria JC (2013) Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *J Biotechnol* **166**: 42–50
- Ardekani LS, Gargari SLM, Rasooli I, Bazl MR, Mohammadi M, Ebrahimzadeh W, Bakherad H & Zare H (2013) A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int J Inf Dis* **17**: e723–e728
- Aronson DE, Costantini LM, Snapp EL (2011) Superfolder GFP is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon. *Traffic* **12**: 543–548
- Asano M, Satoh R, Mochizuki A, Tsuda S, Yamanaka T, Nishiguchi M, Hirai K, Meshi T, Naito S & Ishikawa M (2005) Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Lett* **579**: 4479–4484

- Ashour J, Schmidt F, Hanke L, Cragolini J, Cavallari M, Altenburg A, Brewer R, Ingram J, Shoemaker C & Ploegh H (2014) Intracellular expression of camelid single domain antibodies specific for *influenza virus* nucleoprotein (NP) uncovers distinct features of its nuclear localization. *J Virol* **89**: 2792–2800
- Asurmendi S, Berg RH, Smith TJ, Bendahmane M & Beachy RN (2007) Aggregation of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein-mediated resistance. *Virology* **366**: 98–106
- Audy P, Palukaitis P, Slack SA & Zaitlin M (1994) Replicase-mediated resistance to *Potato virus Y* in transgenic tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 1–22
- Ayadi M, Bouaziz D, Nouri-Ellouz O & Rouis S (2012) Efficient resistance to Potato virus Y infection conferred by cytosolic expression of anti-viral protease single-chain variable fragment antibody in transgenic potato plants. *J Plant Pathol* **94**: 561–569
- Azadi P, Otang NV, Supaporn H, Khan RS, Chin DP, Nakamura I & Mii M (2011) Increased resistance to *cucumber mosaic virus* (CMV) in *Lilium* transformed with a defective CMV replicase gene. *Biotechnol Lett* **33**: 1249–1255

B

- Baccarini P (1902) Roncet. *Viticultura Moderna* **8**: 241–248
- Bajrovic K, Erdag B & Atalay EO (2001) Full resistance to *Tobacco mosaic virus* infection conferred by the transgenic expression of a recombinant antibody in tobacco. *Biotechnol & Biotechnol Eq* **15**: 21–27
- Bak A, Gargani D, Macia JL, Malouvet E, Vernerey MS, Blanc S & Drucker M (2013) Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *J Virol* **87**: 12207–12215
- Bardonnat N, Hans F, Serghini MA & Pinck L (1994) Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of *grapevine fanleaf nepovirus*. *Plant Cell Rep* **13**: 357–360
- Barrera DJ, Rosenberg JN, Chiu JG, Chang YN, Debatis M, Ngoi SM, Chang JT, Shoemaker CB, Oyler GA, Mayfield SP (2015) Algal chloroplast produced camelid V H H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol J* **13**: 117–124
- Baulcombe DC (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 1833–1844
- Baulcombe DC & Dean C (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a019471–a019471
- Baulcombe DC, Chapman S & Cruz S (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* **7**: 1045–1053
- Beachy RN (1999) Coat–protein–mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Phi. Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**: 659–664
- Beck DL, Van Dolleweerd CJ, Lough TJ, Balmori E, Voot DM, Andersen MT, O'Brien IE & Forster RL (1994) Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10310–10314
- Belin C, Schmitt C, Demangeat G, Komar V, Pinck L & Fuchs M (2001) Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology* **291**: 161–171
- Belin C, Schmitt C, Gaire F, Walter B, Demangeat G & Pinck L (1999) The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *J Gen Virol* **80**: 1347–1356
- Belval L, Marmonier A, Gersch S, Komar V, Schmitt-Keichinger C, Vigne E, Lemaire O, Demangeat G & Ritzenthaler C (2015) Towards understanding of *Grapevine fanleaf virus* movement and transmission. 15^e rencontres de virologie végétale, Aussois France.
- Bencurova E, Pulzova L, Flachbartova Z, Bhide M (2015) A rapid and simple pipeline for synthesis of mRNA-ribosome-V_HH complexes used in single-domain antibody ribosome display. *Mol Biosyst.* **11**: 1515–1524
- Bendahmane M, Chen I, Asurmendi S, Bazzini AA, Szecsi J & Beachy RN (2007) Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology* **366**: 107–116
- Bendahmane M, Fitchen JH, Zhang G & Beachy RN (1997) Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**: 7942–7950

- Bercks R, Brückbauer H, Querfurth G & Rüdell M (1977). Untersuchungen über die Viruskrankheiten der Rebe unter besonderer Berücksichtigung "atypischer Formen" der Reissigkrankheit (Investigations on virus diseases of grapevine with special reference to "atypical forms" of Reissigkrankheit). *Weinberg und Keller* **24**: 133–180.
- Bercks VR (1968) Über den Nachweis des Himbeerringflecken-Virus (raspberry ringspot virus) in Reben. *J Phytopathology* **62**: 169–173
- Bienz K, Egger D, Pfister T & Troxler M (1992) Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* **66**: 2740–2747
- Blanc S (2007) Virus Transmission—Getting out and in. In *Viral transport in plants* pp 1–28. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Boonrod K, Galetzka D, Nagy PD, Conrad U & Krczal G (2004) Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nat Biotechnol* **22**: 856–862
- Borg S, Popp F, Hofmann J, Leonhardt H, Rothbauer U & Schüler D (2015) An intracellular nanotrapp redirects proteins and organelles in live bacteria. *MBio* **6**: e02117–14.
- Bortesi L & Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* **33**: 41–52
- Boruah BM, Liu D, Ye D, Gu TJ, Jiang CL, Qu M, Wright E, Wang W, He W, Liu C & Gao B (2013) Single Domain Antibody Multimers Confer Protection against Rabies Infection. *PLoS ONE* **8**: e71383–e71383
- Bouaziz D, Ayadi M, Bidani A, Rouis S, Nouri-Ellouz O, Jellouli R, Drira N & Gargouri-Bouazid R (2009) A stable cytosolic expression of VH antibody fragment directed against PVY NIa protein in transgenic potato plant confers partial protection against the virus. *Plant Science* **176**: 489–496
- Bragard C, Caciagli P, Lemaire O, Lopez-Moya JJ, MacFarlane S, Peters D, Susi P & Torrance L (2013) Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 177–201
- Brandizzi F, Fricker M & Hawes C (2002) A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 520–530
- Braun CJ & Hemenway CL (1992) Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *Plant Cell* **4**: 735–744
- Brederode FT, Taschner PEM, Posthumus E & Bol JF (1995) Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* **207**: 467–474
- Brodersen P & Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**: 268–280
- Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **343**: 313–321

C

- Cadman CH (1956) Studies on the etiology and mode of spread of raspberry leaf curl disease. *Journal of Horticultural Science* **31**: 111–118
- Cadman CH (1963) Biology of soil-borne viruses. *Annu Rev Phytopathol* **1**: 143–172
- Cadman CH, Dias HF & Harrison BD (1960) Sap-transmissible viruses associated with diseases of Grape Vines in Europe and North America. *Nature* **187**: 577–579
- Caljon G, Hussain S, Vermeiren L & Van Den Abbeele J (2015) Description of a nanobody-based competitive immunoassay to detect tsetse fly exposure. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0003456
- Callis J (2014) The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book* **12**: e0174–35
- Campuzano S, Salema V, Moreno-Guzmán M, Gamella M, Yáñez-Sedeño P, Fernández LA & Pingarrón JM (2014) Disposable amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma. *Biosens Bioelectron* **52**: 255–260.
- Cao B, Lei J, Chen G, Cao P, Liu X & Chen Q (2011) Testing of disease-resistance of pokeweed antiviral protein gene (PacPAP) in transgenic cucumber (*Cucumis sativus*). *Afr J Biotechnol* **10**: 6883–6890
- Cardoso FM, Ibañez LI, Van den Hoefcke S, De Baets S, Smet A, Roose K, Schepens B, Descamps FJ, Fiers W, Muyldermans S, Depicker A & Saelens X (2014) Single-domain antibodies targeting neuraminidase protect against an H5N1 influenza virus challenge. *J Virol* **88**: 8278–8296

- Carr JP, Gal-On A, Palukaitis P & Zaitlin M (1994) Replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement. *Virology* **199**: 439–447
- Carr JP, Marsh LE, Lomonosoff GP, Sekiya ME & Zaitlin M (1992) Resistance to *Tobacco mosaic virus* induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 397–404
- Catson (1933) *Q Bull Mich State Univ agric Exp Stn* **16**: 79.
- Caussinus E, Kanca O & Affolter M (2011) Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol* **19**:117–211
- Cazalis-Allut LC & Cazalis F (1865) De la dégénération des vignes. In *Œuvres agricoles de Cazalis-Allut* 57–61
- Cervera M, Esteban O, Gil M, Gorris MT, Martínez MC, Peña L & Cambra M (2010) Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to *Citrus tristeza virus* confers virus resistance. *Transgenic Res* **19**: 1001–1015
- Chaerle L, Van Caeneghem W, Messens E, Lambers H, Van Montagu M & Van Der Straeten D (1999) Presymptomatic visualization of plant|virus interactions by thermography. *Nat Biotechnol* **17**: 813–816
- Chakravarty R, Goel S & Cai W (2014) Nanobody: the ‘magic bullet’ for molecular imaging? *Theranostics* **4**: 386–398
- Chandrasekar V & Johnson JE (1998) The structure of *Tobacco ringspot virus*: a link in the evolution of icosahedral capsids in the picornavirus superfamily. *Structure* **6**: 157–171
- Chapleau RR, Frey JS, Riddle DS, Ruiz ON & Mauzy CA (2014) Measuring single-domain antibody interactions with epitopes in jet fuel using microscale thermophoresis. *Analytical Letters* **48**: 526–530
- Chen A, Wang R, Bever CRS, Xing S, Hammock BD & Pan T (2014) Smartphone-interfaced lab-on-a-chip devices for field-deployable enzyme-linked immunosorbent assay. *Biomicrofluidics* **8**: 064101
- Chen AYS, Walker GP, Carter D & Ng JCK (2011) A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 16777–16782
- Chen B, Jiang J-H & Zhou X-P (2007) A TOM1 homologue is required for multiplication of *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**: 256–259
- Cigsar I, Digiario M & Martelli GP (2002) Sanitary status of grapevines in south-eastern and central Anatolia (Turkey). *EPPO Bulletin* **32**: 471–475
- Cigsar I, Digiario M, Gokalp K, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, De Stradis A, Boscia D & Martelli GP (2003) *Grapevine deformation virus*, a novel nepovirus from turkey. *J Plant Pathol* **85**: 183–191
- Clackson T, Lowman HB (2004) *Phage Display, a practical approach*. Oxford University Press
- Claverie M, Audeguin L, Bloy P, Esmenjaud D & Ollat N (2013) Nemadex Alain Bouquet, a rootstock that delays *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) infections. In *VI International Phylloxera Symposium. Book of abstracts* (p. 33). Presented at 6. International Phylloxera Symposium, Bordeaux, FRA (2013-08-28 - 2013-08-30). <http://prodinra.inra.fr/record/212120>
- Clive J (2014) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Brief* No. 49. ISAAA: Ithaca, NY
- Conrath KE, Muyltermans S, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frère JM, Kinne J & Wyns L (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother* **45**: 2807–2812
- Conway JO, Sherwood LJ, Collazo MT, Garza JA & Hayhurst A (2010) Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents. *PLoS One* **5**: e8818.
- Cooper B, Lapidot M, Heick JA, Dodds JA & Beachy RN (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**: 307–313
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33–38
- Correa A, Pacheco S, Mechaly AE, Obal G, Behar G, Mouratou B, Oppedo P, Alzari PM & Pecorari F (2014) Potent and specific inhibition of glycosidases by small artificial binding proteins (affitins). *PLoS One* **9**: e97438
- Craig RK, Grosveld FG, Janssens RW, Drabek D, Chen T, De Boer E (2014) Soluble “heavy-chain only” antibodies. Patent WO 2010109165 A3

- Csorba T, Kontra L & Burgyán J (2015) Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* **479-480**: 85–103
- Cuesta ÑM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B & Álvarez-Vallina L (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* **28**: 355–362
- Cullen BR, Cherry S & tenOever BR (2013) Is RNA interference a physiologically relevant innate antiviral immune response in mammals? *Cell Host Microbe* **14**: 374–378

D

- Daley LP (2007) The significance of heavy-chain antibodies in camelid immunity. PhD dissertation Cornell University, Ithaca, NY. 151 pp
- Daley LP, Kutzler MA, Bennett BW, Smith MC, Glaser AL & Appleton JA (2010) Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to west Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* **17**: 239–246
- Daley-Bauer LP, Purdy SR, Smith MC, Gagliardo LF, Davis WC & Appleton JA (2010) Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clin Vaccine Immunol* **17**: 2007–2015
- Dammeyer T, Tinnefeld P (2012) Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput Struct Biotechnol J* **3**: e201210013
- Dawson WO & Folimonova SY (2013) Virus-based transient expression vectors for woody crops: a new frontier for vector design and use. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 321–337
- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J & Zambryski P (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J* **3**: 1681–1689
- De Buck S, Nolf J, De Meyer T, Viridi V, De Wilde K, Van Lerberge E, Van Droogenbroeck B, Depicker A (2013) Fusion of an Fc chain to a VHH boosts the accumulation levels in *Arabidopsis* seeds. *Plant Biotechnol J* **11**: 1006–1016
- De Genst E, Muyltermans S, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Wyns L (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4586–4591
- De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, Fiers E & Depicker A (2000) The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol Biol* **43**: 419–428
- de Marco A (2011) Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact* **10**: 44–57.
- De Meyer T, Eeckhout D, De Rycke R, De Buck S, Muyltermans S, Depicker A (2013) Generation of VHH antibodies against the *Arabidopsis thaliana* seed storage proteins. *Plant Mol Biol* **84**: 83–93
- De Meyer T, Laukens B, Nolf J, Van Lerberge E, De Rycke R, Debeuckelaer A, De Buck S, Callewaert N, Depicker A (2015) Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12330
- De Meyer T, Muyltermans S & Depicker A (2014) Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnol* **32**: 263–270.
- De Palma AM, Vlieghe I, De Clercq E & Neyts J (2008) Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med Res Rev* **28**: 823–884
- De Wilde K, De Buck S, Vanneste K & Depicker A (2013) Recombinant antibody production in *Arabidopsis* seeds triggers an unfolded protein response. *Plant Physiol* **161**: 1021–1033
- Demangeat G (2007) Transmission des *Nepovirus* par les nématodes *Longidoridae*. *Virologie*: 1–13
- Demangeat G, Voisin R, Minot J-C, Bosselut N, Fuchs M & Esmenjaud D (2005) 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
- Desmyter A, Spinelli S, Roussel A, Cambillau C (2015) Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Curr Opin Struct Biol* **32**: 1–8
- Di Sansebastiano GP, Paris N, Marc-Martin S, Neuhaus JM (1998) Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J* **15**: 449–457

- Di Wang, Yang S, Yin S, Shang Y, Du P, Guo J, He J, Cai J & Liu X (2015) Characterization of single-domain antibodies against *Foot and Mouth Disease Virus* (FMDV) serotype O from a camelid and imaging of FMDV in baby hamster kidney-21 cells with single-domain antibody-quantum dots probes. *BMC Vet Res.* **11**: 120–129.
- Dietrich C (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J Gen Virol* **84**: 2871–2876
- Dinant S, Kusiak C, Cailleteau B, Verrier JL, Chupeau MC, Chupeau Y, Thi Anh Hong Le, Delon R & Albouy J (1998) Field resistance against potato virus Y infection using natural and genetically engineered resistance genes. *Eur J Plant Pathol* **104**: 377–382
- Djennane S, Gersch S, Goldschmidt V, Keichinger C, Masson J, Perrin M, Hartmann L, Komar V, Gertz C, Vigne E, Marmonier A, Demangeat G & Lemaire O (2013) Résistance aux virus du court-noué par ARN interférence. In 1ère Rencontre du ...
- Dolk E, van der Vaart M, Lutje Hulsik D, Vriend G, de Haard H, Spinelli S, Cambillau C, Frenken L & Verrips T (2005) Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 442–450
- Donson J, Kearney CM, Turpen TH, Khan IA, Kurath G, Turpen AM, Jones GE, Dawson WO & Lewandowski DJ (1993) Broad resistance to Tobamoviruses is mediated by a modified *Tobacco mosaic virus* replicase transgene. *Mol Plant Microbe Interact.* **6**: 635–642
- Doshi R, Chen BR, Vibat CR, Huang N, Lee C-W, Chang G (2014) *In vitro* nanobody discovery for integral membrane protein targets. *Sci Rep.*, **4**: 6760–6767
- Duan C-G, Wang C-H & Guo H-S (2012) Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* **3**: 5–5

E

- Edelbaum D, Gorovits R, Sasaki S, Ikegami M & Czosnek H (2009) Expressing a whitefly GroEL protein in *Nicotiana benthamiana* plants confers tolerance to tomato yellow leaf curl virus and cucumber mosaic virus, but not to grapevine virus A or tobacco mosaic virus. *Arch Virol.* **154**: 399–407
- Ehara Y, Nakamura S, Yoshikawa M, Shirasawa N & Taira H (1994) Resistance to viruses in transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* plants introduced mammalian 2,5-Oligoadenylate Synthetase cDNA. *Tohoku J Agr Res.* **44**: 1–6
- Eichmeier A, Baránek M & Pidra M (2011) Genetic variability of grapevine fanleaf virus isolates within genes 1B^{Hel} and 1E^{Pol}. *J Plant Pathol* **93**: 511–515
- Elbeaino T, Kiyi H, Boutarfa R, Minafra A, Martelli GP & Digiario 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. *Arch Virol* **159**: 2757–2764
- Elbeaino T, Martelli GP, Digiario M & Ghebremeskel S (2012) 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
- Esmenjaud D & Bouquet A (2009) Selection and Application of Resistant Germplasm for Grapevine Nematodes Management. In *Integrated Management of Fruit Crops Nematodes*, Ciancio A & Mukerji KG (eds) pp 195–214. Dordrecht: Springer Netherlands
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2009) Soil test for virus–vector nematodes in the framework of EPPO Standard PM 4 Schemes for the production of healthy plants for planting of fruit crops, grapevine, *Populus* and *Salix*. *EPPO Bulletin* **39**: 284–288
- Even-Desrumeaux K, Baty D & Chames P (2010) Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol Biosyst* **6**: 2241–2248
- Eyer L, Hruska K (2012) Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review. *Vet Med* **57**: 439–513
- Ezzine A, Adab El SM, Bouhaouala-Zahar B, Hmila I, Baciou L, Marzouki MN (2012) Efficient expression of the anti-Aahl' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnol Appl Biochem* **59**: 15–21

F

- Family - Secoviridae. In *Virus taxonomy, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds), pp 881-899. San Diego: Elsevier
- Farnham G & Baulcombe DC (2006) Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18828–18833
- Fatima A, Wang H, Kang K, Xia L, Wang Y, Ye W, Wang J & Wang X (2014) Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. *PLoS One* **9**: e95263
- Fecker LF, Koenig R & Obermeier C (1997) *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch Virol* **142**: 1857–1863
- Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 4068–4076
- Ferreira SA, Pitz KY, Manshardt R, Zee F, Fitch M & Gonsalves D (2002) Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii. *Plant Dis* **86**: 101–105
- Fitchen JH & Beachy RN (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol* **47**: 739–763
- Flajnik MF & Kasahara M (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* **11**: 47–59
- Flajnik MF, Muyldermans S & Deschacht N (2011) A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS Biol* **9**: e1001120 .
- Fleetwood F, Devoogdt N, Pellis M, Wernery U, Muyldermans S, Ståhl S, Löfblom J (2013) Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci*. **70**: 1081–1093
- Fomitcheva VW, Schubert J, Saalbach I, Habekuß A, Kumlehn J & Conrad U (2005) Bacterial expression and characterization of a single-chain variable fragment antibody specific to several replicases of plant (+)RNA viruses. *J Phytopathology* **153**: 633–639
- Fraile S, Jiménez JI, Gutiérrez C, de Lorenzo V (2013) NanoPad: An integrated platform for bacterial production of camel nanobodies aimed at detecting environmental biomarkers. *Proteomics* **13**: 2766–2775
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL & Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **80**: 4803–4807
- Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, Verrips CT (2000) Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **78**: 11–21
- Fridy PC, Li Y, Keegan S, Thompson MK, Nudelman I, Scheid JF, Oeffinger M, Nussenzweig MC, Fenyö D, Chait BT, Rout MP (2014) A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods* **11**: 1253–1260
- Fromme FD, Wingard SA & Priode CN (1927) Ringspot of Tobacco: an infectious disease of unknown cause. *Phytopathology* **17**: 321–328 .
- Fuchs M (2008) Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes: état de l'art et perspectives. *Virologie* **12**: 27–37
- Fuchs M (2009) Plant resistance to viruses: engineered resistance. In *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology* pp 44–52. Academic Press
- Fuchs M & Gonsalves D (1995) Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Nat Biotechnol* **13**: 1466–1473
- Fuchs M & Gonsalves D (2007) Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 173–202
- Fuchs M, Ferreira S & Gonsalves D (1997) Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Mol Plant Pathol On-line* Available at: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs/>

- Fuchs M, Pinck M, Serghini MA, Ravelonandro M, Walter B & Pinck L (1989) The nucleotide sequence of satellite RNA in Grapevine fanleaf virus, strain F13. *J Gen Virol* **70** : 955–962
- Fuchs M, Tricoli DM, Carney KJ, Schesser M, McFerson JR & Gonsalves D (1998) Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. *Plant Dis* **82**: 1350–1356

G

- Gaire F, Schmitt C, Stussi-Garaud C, Pinck L & Ritzenthaler C (1999) Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**: 25–36
- Gambino G, Perrone I, Carra A, Chitarra W, Boccacci P, Torello Marinoni D, Barberis M, Maghuly F, Laimer M & Gribaudo I (2010) Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Res* **19**: 17–27
- Génération Futures (2013) L'enquête APAChe : Analyse de pesticides agricoles dans les cheveux.
<http://www.generations-futures.fr/pesticides/lenquete-apache-analyse-de-pesticides-agricoles-dans-les-cheveux/>
- Geoghegan EM, Zhang H, Desai PJ, Biragyn A & Markham RB (2015) Antiviral activity of a single-domain antibody immunotoxin binding to glycoprotein D of Herpes simplex virus 2. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 527–535
- Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS lett* **414**: 521–526.
- Ghannam A, Kumari S, Muyldermans S & Abbady AQ (2015) Camelid nanobodies with high affinity for *Broad bean mottle virus*: a possible promising tool to immunomodulate plant resistance against viruses. *Plant Mol Biol* **87**: 355–69
- Ghassabeh GH, Saerens D, Muyldermans S (2010) Isolation of antigen-specific Nanobodies. In *Antibody Engineering* pp 251–266 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Ghoshal B & Sanfaçon H (2015) Symptom recovery in virus-infected plants_ Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology* **479–480**: 167–179
- Gilmer RM (1970) A new grapevine disease induced by *Tobacco ringspot virus*. *Phytopathology* **60**: 619
- Goëb V, Ardizzone M, Arnaud L, Avouac J, Baillet A, Belot A, Bouvard B, Coquerelle P, Dadoun S, Diguët A, Launay D, Lebouc D, Loulergue P, Mahy S, Mestat P, Mouterde G, Terrier B, Varoquier C, Verdet M, Puéchal X, et al (2013) Recommendations for using TNF α antagonists and French Clinical Practice Guidelines endorsed by the French National Authority for Health. *Joint Bone Spine* **80**: 574–581
- Gokalp K, Digiario M & Cigsar I (2003) Properties of a previously undescribed nepovirus from South-East Anatolia. *J Plant Pathol* **85**: 35–41
- Goldman ER, Anderson GP, Liu JL, Delehanty JB, Sherwood LJ, Osborn LE, Cummins LB, Hayhurst A (2006) Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* **78**: 8245–8255
- Golemboski DB, Lomonosoff GP & Zaitlin M (1990) Plants transformed with a *Tobacco mosaic virus* nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6311–6315
- Gómez-Sebastián S, Nuñez MC, Garaicoechea L, Alvaredo C, Mosgovoij M, Lasa R, Kahl A, Wigdorovitz A, Parreño V, Escribano JM (2012) Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective *in vivo*. *BMC Biotechnol* **12**: 59–69
- Gonsalves D (1998) Control of *Papaya ringspot virus* in papaya: a case study. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 415–437
- Gonsalves D (2014) Hawaii's transgenic papaya story 1978–2012: A personal account. In *Genetics and Genomics of Papaya*, Ming R & Moore PH (eds) pp 115–142. New York, NY: Springer New York
- Gonsalves D, Chee P, Provvidenti R, Seem R & Slightom JL (1992) Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by *Cucumber mosaic virus* under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Nat Biotechnol* **10**: 1562–1570
- Goodchild SA, Dooley H, Schoepp RJ, Flajnik M, Lonsdale SG (2011) Isolation and characterisation of Ebolavirus-specific recombinant antibody fragments from murine and shark immune libraries. *Mol Immunol* **48**: 2027–2037
- Gosalvez-Bernal B, Genoves A, Navarro JA, Pallas V & Sanchez-Pina MA (2008) Distribution and pathway for phloem-dependent movement of *Melon necrotic spot virus* in melon plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 447–461

- Gottschamel J (2008) Detection of VLPs by ISEM in transgenic grapevines expressing different GFLV CP-constructs. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplom Ingenieur der Universität für Bodenkultur, Wien, Austria
- Gottula J & Fuchs M (2009) Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. In *Natural and engineered resistance to plant viruses, Part I* pp 161–183. Elsevier
- Gottula J, Lapato D, Cantilina K, Saito S, Bartlett B & Fuchs M (2013) Genetic variability, evolution, and biological effects of *Grapevine fanleaf virus* satellite RNAs. *Phytopathology* **103**: 1180–1187
- Goulet C, Khalf M, Sainsbury F, D'Aoust M-A, Michaud D (2011) A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnol J* **10**: 83–94
- Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H and Laliberté J-F (2013) 6K2-induced vesicles can move cell to cell during *Turnip mosaic virus* infection. *Front. Microbiol* **4**:351. doi: 10.3389/fmicb.2013.00351
- Groll N, Emele F, Poetz O & Rothbauer U (2015) Towards multiplexed protein–protein interaction analysis using protein tag-specific nanobodies. *J Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.017
- Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK & Tsien RY (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11990–11995
- Guedon JT, Luo K, Zhang H & Markham RB (2015) Monoclonal and single domain antibodies targeting β -integrin subunits block sexual transmission of HIV-1 in *in vitro* and *in vivo* model systems. *J Acquir Immune Defic Syndr* **69**: 278–285
- Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK & Park SW (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol Mol Plant P* **78**: 51–65
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ & Gomez-Lim MA (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat Biotechnol* **17**: 1223–1226

H

- Habib I, Muyldermans S, Smolarek D, Hattab C, Grodecka M, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Sagan S, Gutiérrez C, Laperche S, Le-Van-Kim C, Aronovicz YC, Wasniowska K, Gangnard S, Bertrand O (2013) VHH (nanobody) directed against human glycoporphin A: A tool for autologous red cell agglutination assays. *Anal Biochem* **438**: 82–89
- Hagiwara-Komoda Y, Hirai K, Mochizuki A, Nishiguchi M, Meshi T & Ishikawa M (2008) Overexpression of a host factor TOM1 inhibits tomato mosaic virus propagation and suppression of RNA silencing. *Virology* **376**: 132–139
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Robinson G, Songa EB, Bendahman N, Hamers R & Muyldermans S (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**: 446–448
- Hans F, Pinck M & Pinck L (1993) Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). *Biochimie* **75**: 597–603
- Harmsen MM, Fijten HPD, Dekker A & Eblé PL (2008) Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin. *Vet Microbiol* **132**: 56–64
- Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bommel AM, Niewold TA & van Zijderveld FG (2006) Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 544–551
- Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K & Theakston RDG (2006) 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
- Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S (2013) Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* **8**: 1013–1026
- Hattori T, Umetsu M, Nakanishi T, Sawai S, Kikuchi S, Asano R, Kumagai I (2012) A high-affinity gold-binding camel antibody: Antibody engineering for one-pot functionalization of gold nanoparticles as biointerface molecules. *Bioconjug Chem* **23**: 1934–1944
- Havelda Z, Vrallyay V, Vlczi A & Burgyn J (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal* **55**: 278–288

- He T, Wang Y, Li P, Zhang Q, Lei J, Zhang Z, Ding X, Zhou H, Zhang W (2014) Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol. *Anal Chem.* **86**: 8873–8880
- Hellwald KH & Palukaitis P (1995) Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus*. *Cell* **83**: 937–946
- Helma J, Schmidthals K, Lux V, Nüske S, Scholz AM, Kräusslich H-G, Rothbauer U & Leonhardt H (2011) Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells. *PLoS ONE* **7**: e50026–e50026
- Hemmer C, Vigne E, Goldschmit V, Komar V, Marmonier A, Valat L, Demangeat G, Vigneron S, Masson JE & Lemaire O (2009) Transgenic rootstocks expressing GFLV coat protein gene in a three years field trial; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchange between rootstock and scion. In *16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (ICVG)*, Dijon, France pp 228–229
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M & Schell J (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature.* **303**: 209–213
- Herrera M G, Madariaga V M (2001) Presence and incidence of grapevine viruses in central zone of Chile. *Agricultura Técnica* **61**: 393–400.
- Hewitt W B (1954) Some virus and virus-like diseases of grapevines. *Bull. Calif. Dep. Agricult.* **43**: 47–64.
- Hewitt WB & Raski DJ (1958) Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology.* **48**: 586–595
- Hewitt WB, Goheen AC, Raski DJ & Gooding GV (1962) Studies on virus diseases of the grapevine in California. *Vitis.* **3**: 57–83
- Hiatt AA, Cafferkey RR & Bowdish KK (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* **342**: 76–78
- Hmila I, Saerens D, Ben Abderrazek R, Vincke C, Abidi N, Benlasfar Z, Govaert J, Ayeb El M, Bouhaouala-Zahar B & Muyldermans S (2010) A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* **24**: 3479–3489
- Hofmann C (2007) Analysis of the role of the actin cytoskeleton in the cell-to-cell transport of *Tobacco mosaic virus* (TMV) and of the secretory pathway in the targeting of the *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) movement protein to plasmodesmata. Thèse de l'université Louis Pasteur, Strasbourg, France 289 pp
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A & Hoffmann N (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science.* **223**: 496–498
- Horváth J, Tóbiás I & Hunyadi K (1994) New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Kertészeti Tudomány.* **26**: 31–32
- Huang L, Muyldermans S & Saerens D (2010) Nanobodies: proficient tools in diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* **10**: 777–785
- Huang X, Stein BD, Cheng H, Malyutin A, Tsvetkova IB, Baxter DV, Remmes NB, Verchot J, Kao C, Bronstein LM & Dragnea B (2011) Magnetic virus-like nanoparticles in *N. benthamiana* plants: a new paradigm for environmental and agronomic biotechnological research. *ACS Nano.* **5**: 4037–4045
- Hull R (2014) *Plant Virology* 5th edition Elsevier
- Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer JG, Ng KKS, MacKenzie R, Tanha J (2011) Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem.* **286**: 8961–8976
- Hussack G, Hiramata T, Ding W, MacKenzie R & Tanha J (2011) Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One.* **6**: e28218
- Hwang C-FC, Xu KK, Hu RR, Zhou RR, Riaz SS & Walker MAM (2010) Cloning and characterization of XiR1, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. *Theor Appl Genet.* **121**: 789–799
-
- Ilardi V & Tavazza M (2015) Biotechnological strategies and tools for Plum pox virus resistance: trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Front Plant Sci.* **6**: 1–16
- Ismaili A, Jalali-Javaran M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F, Forouzandeh-Moghadam M, Memari HR (2007) Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi). *Biotechnol Appl Biochem.* **47**: 11–19

Izadpanah K, Zaki-Aghl M, Zhang YP, Daubert SD & Rowhani A (2003) Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. *Plant Dis.* **87**: 1179–1182

J

Janeway CAJ, Travers P, Walport M & Shlomchik MJ (2001) Immunobiology: the immune system in health and disease 5th ed. New York: Garland Science

Jankulova M, Savino V, Gallitelli D, Quacquarelli A & Martelli G P (1978) Isolation of *Artichoke Italian latent virus* from the grapevine in Bulgaria. *Proc. 6th meeting ICVG, Cordoba Monografias INIA.* **18**: 143–147.

Janssens R, Dekker S, Hendriks RW, Panayotou G, van Remoortere A, San JK-A, Grosveld F, Drabek D (2006) Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 15130–15135

Jardak-Jamoussi R, Winterhagen P, Bouamama B, Dubois C, Mliki A, Wetzel T, Ghorbel A & Reustle GM (2009) Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **97**: 187–196

Jarugula S, Gowda S, Dawson WO & Naidu RA (2012) Development of full length infectious cDNA clone of Grapevine Leafroll-associated Virus 3. In APS annual meeting, Charlotte NC pp 70–71.

Jelly NS, Schellenbaum P, Walter B & Maillot P (2012) Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Res.* **21**: 1319–1327

Jiang W, Cossey S, Rosenberg JN, Oyler GA, Olson BJ & Weeks DP (2014) 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**: 244–255

Jiménez JI, Fraile S, Zafra O & de Lorenzo V (2015) Phenotypic knockouts of selected metabolic pathways by targeting enzymes with camel-derived nanobodies (VHHs). *Metab Eng.* **30**:40–48

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA & Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**: 816–821

Jittavisutthikul S, Thanongsaksrikul J, Thueng-in K, Chulanetra M, Srimanote P, Seesuy W, Malik A & Chaicumpa W (2015) Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. *Viruses.* **7**: 2030–2056

Jobling SA, Jarman C, Teh M-M, Holmberg N, Blake C & Verhoeyen ME (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol.* **21**: 77–80

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* **14**: 946–961.

Jongedijk E & Verheesen P (2012) Insect binding antibodies. Patent WO/2012/025602 A1

Jongedijk E & Verheesen P (2011) Specific delivery of agrochemicals. Patent WO/2011/124612

Joo KI, Tai A & Wang P (2010) Imaging and Tracking of Viruses Using Quantum Dots. In *Nanomaterials for the Life Sciences Vol. 6* pp 219-249

Joosten V, Roelofs MS, van den Dries N, Goosen T, Verrips CT, van den Hondel CAMJJ & Lokman BC (2005) Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: Llama variable heavy chain antibody fragment (VHH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). *J Biotechnol.* **120**: 347–359

Julve JM, Gandía A, Fernández-Del-Carmen A, Sarrion-Perdigones A, Castelijns B, Granell A, Orzáez D (2013) A coat-independent superinfection exclusion rapidly imposed in *Nicotiana benthamiana* cells by *Tobacco mosaic virus* is not prevented by depletion of the movement protein. *Plant Mol Biol.* **81**: 553–564

K

Kakani K, Robbins M & Rochon D (2003) Evidence that binding of cucumber necrosis virus to vector zoospores involves recognition of oligosaccharides. *J Virol.* **77**: 3922–3928

Kaliberov SA, Kaliberova LN, Buggio M, Tremblay JM, Shoemaker CB & Curiel DT (2014) Adenoviral targeting using genetically incorporated camelid single variable domains. *Lab Invest.* **94**: 893–905

Kandalaf H, Hussack G, Aubry A, van Faassen H, Guan Y, Arbabi Ghahroudi M, MacKenzie R, Logan SM & Tanha J (2015) Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi 10.1007/s00253-015-6594-1

- Kastelic D, Frković-Grazio S, Baty D, Truan G, Komel R, Pompon D (2009) A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *J Immunol Methods*. **350**: 54–62
- Katoh Y, Nozaki S, Hartanto D, Miyano R & Nakayama K (2015) Multisubunit complex architectures revealed by visible immunoprecipitation (VIP) assay using fluorescent fusion proteins. *J Cell Sci*. **128**: 2351–2362
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB & Lefkowitz EJ (2012) Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses
- Knapp E, da Câmara Machado A, Pühringer H, Wang Q, Hanzer V, Weiss H, Weiss B, Katinger H & Laimer da Câmara Machado M (1995) Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *Journal of Virological Methods* **55**: 157–173
- Kol S, Kallehauge TB, Adema S & Hermans P (2015) Development of a VHH-based erythropoietin quantification assay. *Mol Biotechnol*. **57**: 692–700
- Komar V, Vigne E, Demangeat G, Lemaire O & Fuchs M (2008) Cross-protection as control strategy against *Grapevine fanleaf virus* in naturally infected vineyards. *Plant Dis*. **92**: 1689–1694
- Koromyslova AD & Hansman GS (2014) Nanobody binding to a conserved epitope promoted human norovirus particle disassembly. *J Virol*. **89**: 2718–2730
- Koussoroplis SJ & Vanbever R (2013) Peptides and proteins: pulmonary absorption. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology* pp 2607–2618
- Krüger C, Hultberg A, Marcotte H, Hermans P, Bezemer S, Frenken LGJ & Hammarström L (2006) Therapeutic effect of llama derived VHH fragments against *Streptococcus mutans* on the development of dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol*. **72**: 732–737
- Kruger D, Fourie JC & Malan AP (2013) Cover crops with biofumigation properties for the suppression of plant-parasitic nematodes: a review. *S. Afr J Enol Vitic*. **34**: 287–295
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J & Kobilka BK (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**: 101–106
- Kubala MH, Kovtun O, Alexandrov K, Collins BM (2010) Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex. *ProteinSci*. **19**: 2389–2401
- Kumaran J, Mackenzie CR, Arbabi Ghahroudi M (2012) Semiautomated panning of naive *Camelidae* libraries and selection of single-domain antibodies against peptide antigens, In *Single domain antibodies*, pp. 105–124. Eds D Saerens and S Muyldermans. Totowa, NJ: Humana Press
- Kung YJ, Lin SS, Huang YL, Chen TC, Harish SS, Chua N-H & Yeh S-D (2011) Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. *Mol Plant Pathol*. **13**: 303–317
- Kurth EG, Peremyslov VV, Prokhnevsky AI, Kasschau KD, Miller M, Carrington JC & Dolja VV (2012) Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *J Virol*. **86**: 6002–6009
- Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G & Kreuze JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci USA*. **112**: 5844–5849

L

-
- Ladenson RC, Crimmins DL, Landt Y, Ladenson JH (2006) Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal Chem*. **78**: 4501–4508
- Lai-Kee-Him J, Schellenberger P, Dumas C, Richard E, Trapani S, Komar V, Demangeat G, Ritzenthaler C & Bron P (2013) The backbone model of the *Arabidopsis mosaic virus* reveals new insights into functional domains of Nepovirus capsid. *J. Struct. Biol*. **182**: 1–9
- Laimer M, Lemaire O, Herrbach E, Goldschmidt V, Minafra A, Bianco P & Wetzler T (2009) Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: a review. *J Plant Pathol*. **91**: 7–23
- Lamprecht R, Spaltman M, Stephan D, Wetzler T & Burger J (2013) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of Grapevine fanleaf virus and its associated satellite RNA. *Viruses* **5**: 1815–1823

- Laporte C, Vetter G, Loudes AM, Robinson DG, Hillmer S, Stussi-Garaud C & Ritzenthaler C (2003) 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
- Lauwereys M (1998) Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. **17**: 3512–3520.
- Laveau C, Helden M, Darrietort G, Esmenjaud D & Demangeat G (2013) First detection of *Tomato black ring virus* (TBRV) in a French vineyard. *J Int Sci Vigne Vin* **47**: 191–194
- Leduc C, Si S, Gautier J, Soto-Ribeiro M, Wehrle-Haller B, Gautreau A, Giannone G, Cognet L & Lounis B (2013) A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging. *Nano Lett*. **13**: 1489–1494.
- Lentz EM, Garaicoechea L, Alfano EF, Parreño V, Wigdorovitz A, Bravo-Almonacid FF (2012) Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. *Virus Genes*. **236**: 703–714
- Li F & Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci*. **17**: 526–537
- Li M, Kakani K, Katpally U, Johnson S, Rochon D & Smith TJ (2013) Atomic structure of *Cucumber necrosis virus* and the role of the capsid in vector transmission. *J Virol*. **87**: 12166–12175
- Li T, Bourgeois JP, Celli S, Glacial F, Le Sourd AM, Mecheri S, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Rougeon F, Lafaye P (2012) Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J*. **26**: 3969–3979
- Liebenberg A, Freeborough MJ, Visser CJ, Bellstedt DU & Burger JT (2009) Genetic variability within the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus* isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Res*. **142**: 28–35
- Lindbo JA & Dougherty WG (1992a) Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol Plant Microbe Interact*. **5**: 144–153
- Lindbo JA & Dougherty WG (1992b) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725–733
- Lindbo JA & Dougherty WG (2005) Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu Rev Phytopathol*. **43**: 191–204
- Lister RM (1964) Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. *Ann Appl Biol* **54**: 167–176
- Liu JL, Anderson GP, Delehanty JB, Baumann R, Hayhurst A, Goldman ER (2007a) Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library. *Mol Immunol*. **44**: 1775–1783
- Liu JL, Anderson GP, Goldman ER (2007b) Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library. *BMC Biotechnol*. **7**: 78–78
- Liu X, Xu Y, Wan D-B, Xiong YH, He ZY, Wang XX, Gee SJ, Ryu D, Hammock BD (2015) 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
- Liu Z, Scorza R, Hily J-M, Scott SW & James D (2007) Engineering resistance to multiple prunus fruit viruses through expression of chimeric hairpins. *J Amer Soc Hort Sci*. **132**: 407–414
- Lodge JK, Kaniewski WK & Tumer NE (1993) Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**: 7089–7093
- Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S & Baulcombe D (1993) Extreme resistance to *Potato virus X* infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO J*. **12**: 379–386
- Lopez Cardoso FM, Itat L, Schepens B & Saelens X (2012) Single domain camelid antibodies that neutralize negative strand viruses. In *Antiviral drugs - Aspects of clinical use and recent advances*. Arbuthnot P (ed) InTech. Rijeka, Croatia
- Lovato A, Faoro F, Gambino G, Maffi D, Bracale M, Polverari A & Santi L (2014) Construction of a synthetic infectious cDNA clone of *Grapevine Algerian latent virus* (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Viol J*. **11**: 186–200

Lucioli A, Noris E, Brunetti A, Tavazza R, Ruzza V, Castillo AG, Bejarano ER, Accotto GP & Tavazza M (2003) *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* Rep-derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. *J. Virol.* **77**: 6785–6798

Lülf S, Matz J, Rouyez M-C, Järviluoma A, Saksela K, Benichou S & Geyer M (2014) Structural basis for the inhibition of HIV-1 Nef by a high-affinity binding single-domain antibody. *Retrovirology.* **11**: 24

M

MacFarlane SA & Davies JW (1992) Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from *Pea early browning virus* RNA1 are resistant to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 5829–5833

Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW & Voinnet O (2013) Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science.* **342**: 235–238

Maiti IB, Murphy JF, Shaw JG & Hunt AG (1993) Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6110–6114

Majorana G & Rana GL (1970) Un nuovo virus latente isolato da Carciofo in Puglia / A new latent virus isolated from Artichoke in Apulia. *Phytopathologia Mediterranea* **9**: 193–196

Maliogka VI, Martelli GP, Fuchs M & Katis NI (2015) Control of viruses infecting grapevine. *Adv Virus Res.* **91**:175–227.

Marconi P, Alvarez MA (2014) State of the art on plant-made single-domain antibodies. *J Immunol Tech Infect Dis.*, **03**: 1–6

Margis R, Hans F & Pinck L (1993a) VPg Northern-immunoblots as a means for detection of viral RNAs in protoplasts or plants infected with grapevine fanleaf nepovirus. *Arch Virol.* **131**: 225–232

Margis R, Ritzenthaler C, Reinbolt J, Pinck M & Pinck L (1993b) Genome organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA2 deduced from the 122K polyprotein P2 *in vitro* cleavage products. *J Gen Virol.* **74**: 1919–1926

Margis R, Viry M, Pinck M & Pinck L (1991) Cloning and *in vitro* characterization of the grapevine fanleaf virus proteinase cistron. *Virology* **185**: 779–787

Marmonier A, Schellenberger P, Esmenjaud D, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Andret-Link P, Lemaire O, Fuchs M & Demangeat G (2010) The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *J Plant Pathol.* **92**: 275–279

Martelli G P (1965) Preliminary report on purification and serology of a virus associated with Hungarian grapevines showing macroscopic symptoms of fanleaf and yellow mosaic. *Proceedings International Conference on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to Vitis, Davis, USA*: 402–410.

Martelli GP (1993) Grapevine degeneration - fanleaf. In *Graft-transmissible diseases of grapevines, handbook for detection and diagnosis*. Martelli GP (ed) pp 9–17. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Martelli GP (2010) Virus diseases of grapevine. *eLS* DOI: 10.1002/9780470015902.a0000766.pub3

Martelli GP (2014) Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J Plant Pathol.* **96**: 1–136

Martelli G P, Gallitelli D, Abracheva P, Savino V, Quacquarelli A (1977) Some properties of *Grapevine Bulgarian latent virus*. *Ann Appl Biol* **85**: 51–58

Martelli GP & Piro G (1975) Virus diseases of the grapevine in a Sicilian herbarium of the past century. *Vitis* **13**: 329–335

Martinière A, Bak A, Macia J-L, Lautredou N, Gargani D, Doumayrou J, Garzo E, Moreno A, Fereres A, Blanc S & Drucker M (2013) A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife* **2**: e00183

Matz J, Hérate C, Bouchet J, Dusetti N, Gayet O, Baty D, Benichou S, Chames P (2014) Selection of intracellular single-domain antibodies targeting the HIV-1 Vpr protein by cytoplasmic yeast two-hybrid system. *PLoS One.* **9**: e113729

Maur der AA, Tissot K & Barberis A (2004) Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* **34**: 215–224

- Mayo MA, Robertson WM, Legorboru FJ & Brierley KM (1994) Molecular Approaches to an understanding of the transmission of plant viruses by nematodes. In *Advances in Molecular Plant Nematology*, Lamberti F De Giorgi C & Bird DM (eds) pp 277–293. Boston, MA: Springer US
- McCoy LE, Rutten L, Frampton D, Anderson I, Granger L, Bashford-Rogers R, Dekkers G, Strokappe NM, Seaman MS, Koh W, Grippo V, Kliche A, Verrips T, Kellam P, Fassati A, Weiss RA (2014) Molecular evolution of broadly neutralizing llama antibodies to the CD4-binding site of HIV-1 *PLoS Pathogens*. **10**: e1004552
- 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
- Meng B, Venkataraman S, Li C, Wang W, Dayan-Glick C & Mawassi M (2013) Construction and biological activities of the first infectious cDNA clones of the genus *Foveavirus*. *Virology*. **435**: 453–462
- Merdinoglu D, Merdinoglu-Wiedemann S, Mestre P, Prado E & Schneider C (2009) Apport de l'innovation variétale dans la réduction des intrants phytosanitaires au vignoble : exemple de la résistance au mildiou et à l'oïdium. *Progrès Agricole et Viticole* **126**: 244–247
- Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA, Lukyanov S, Gadella TW, Chudakov DM (2007) Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* **4**: 555–557
- Mestre P, Brigneti G, Durrant MC & Baulcombe DC (2003) Potato virus Y NIa protease activity is not sufficient for elicitation of Ry-mediated disease resistance in potato. *Plant J*. **36**: 755–761
- Minaeian S, Rahbarizadeh F, Zarkesh-Esfahani SH, Ahmadvand D, Broom OJ (2012) Neutralization of human papillomavirus by specific Nanobodies against major capsid protein L1. *J Microbiol Biotechnol*. **22**: 721–728
- Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M, & Tsagris M (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding* **14**: 185–197
- Miyazaki N, Kiyose N, Akazawa Y, Takashima M, Hagihara Y, Inoue N, Matsuda T, Ogawa R, Inoue S, Ito Y (2015) Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by high throughput sequencing. *J Biochem*. doi: 10.1093/jb/mvv038
- Monaghan P (2004) The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol*. **85**: 933–946
- Monegal A, Ami D, Martinelli C, Huang H, Aliprandi M, Capasso P, Francavilla C, Ossolengo G, de Marco A (2009) Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naïve library. *Protein Eng Des Sel*. **22**: 273–280
- Monegal A, Olichon A, Bery N, Filleron T, Favre G, de Marco A (2012) Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (*Lama glama*) naïve libraries. *Dev Comp Immunol*. **36**: 150–156
- Morgun B (2005) Expression of dsRNA-specific monoclonal antibodies in transgenic plants. PhD Thesis, University of Szeged, Hungary
- Morrone M, Thompson JR & Tepfer M (2008) Twenty years of transgenic plants resistant to *Cucumber mosaic virus*. *Mol Plant Microbe Interact*. **21**: 675–684
- Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. *Journal of Biotechnology* **74**: 277–302
- Muyldermans S (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu Rev Biochem*. **82**: 775–797
- Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA & Hamers R (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng*. **7**: 1129–1135
- Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G & Saerens D (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. **128**: 178–183

N

- Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kitta K, Akiyama H, Teshima R & Nishimaki-Mogami T (2014) Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biol Pharm Bull*. **37**: 1–5
- Naraghi-Arani P, Daubert S & Rowhani A (2001) Quasispecies nature of the genome of *Grapevine fanleaf virus*. *J Gen Virol*. **82**: 1791–1795

- Nelson RS, McCormick SM, Delannay X, eacute PD, Layton J, Anderson EJ, Kaniewska M, Proksch RK, Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT & Beachy RN (1988) Virus tolerance, plant performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Nat Biotechnol.* **6**: 403–409
- Neu U, Allen S-AA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, Ströh LJ, Feizi Ten, Peters T, Atwood WJ & Stehle T (2012) A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* **9**: e1003688
- Nguyen L, Lucas WJ, Ding B & Zaitlin M (1996) Viral RNA trafficking is inhibited in replicase-mediated resistant transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 12643–12647
- Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD & Chua N-H (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol.* **24**: 1420–1428
- Nölke G, Cobanov P, Uhde-Holzem K, Reustle G, Fischer R & Schillberg S (2009) Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and *Arabis mosaic virus* (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol.* **10**: 41–49

O

- Oka Y (2014) Nematicidal activity of fluensulfone against some migratory nematodes under laboratory conditions. *Pest Manag Sci.* **70**: 1850–1858
- Okazaki F., Aoki J.-I., Tabuchi S., Tanaka T., Ogino C., Kondo A. (2012) Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama variable heavy-chain antibody fragment V(HH) against EGFR. *Applied microbiology and biotechnology*, **96**, 81–88.
- Olichon A & Surrey T (2007) Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**: 36314–36320
- Olichon A, Schweizer D, Muyldermans S & de Marco A (2007) Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol.* **7**: 7–14.
- Oliveira S, Heukers R, Sornkom J, Kok RJ & van Bergen en Henegouwen PMP (2013) Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. *J Control Release* **172**: 607–617
- Oliver JE & Fuchs M (2011a) Fanleaf degeneration/decline disease of grapevines. <http://www.nysipm.cornell.edu/nysipm/factsheets/grapes/diseases/fanleaf.pdf>
- Oliver JE & Fuchs M (2011b) 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
- Oliver JE, Vigne E & Fuchs M (2010) Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Res.* **152**: 30–40
- Oparka KJ, Roberts AG, Cruz SS, Boevink P, Prior DAM & Smallcombe A (1997) Using GFP to study virus invasion and spread in plant tissues. *Nature* **388**: 401–402
- Orzáez D., Julve J.M., Granell R.A., Sarrion-Perdigones A., Gutiérrez C. (2014) Method for the production of complex repertoires of recombinant molecules. Patent WO/2014/044892 A1
- Ouertani R, Savino V, Minafra A, Boscia D, Castellano MA, Martelli GP & Greco N (1992) Properties of a previously undescribed grapevine nepovirus from Tunisia. *Archives of Virology* **126**: 107–117

P

- Palomares Rius JE, Gutiérrez Gutiérrez C, Cantalapiedra Navarrete C & Castillo P (2012) Prevalence and diversity of *Grapevine fanleaf virus* in southern Spain. *Plant Pathol.* **61**: 1032–1042
- Panjan M & Saric A (1963) Serological detection of *Arabis mosaic virus* in grapevine and sweet cherry by gel diffusion technique. *Agronomski Glasnik* **3**: 204–206
- Pant N, Hultberg A, Zhao Y, Svensson L, Pan-Hammarstrom Q, Johansen K, Pouwels PH, Ruggeri FM, Hermans P, Frenken L, Boren T, Marcotte H & Hammarström L (2006) Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J Infect Dis* **194**: 1580–1588
- Pantanelli E (1912) Su la ripartizione dell'arriccamento (roncet) della vite secondo la natura e la giacitura del terreno. *Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane XLV*: 249–301
- Panza P, Maier J, Schmees C, Rothbauer U & Söllner C (2015) Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. *Development* **142**: 1879–1884

- Paraschiv G, Muyldermans S, Vincke C, Czaplowska P, Manea M & Przybylski M (2012) 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
- Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, Muyldermans S, Hol WGJ, Kobilka BK & Steyaert J (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc* **9**: 674–693
- Parent J-S, Martínez de Alba AE & Vaucheret H (2012) The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Front Plant Sci* **3**: 179–187
- Pédelacq J-D, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC & Waldo GS (2005) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79–88
- Pellis M., Muyldermans S., Pardon E., Zolghadr K., Rothbauer U., Vincke C., Kinne J., Dierynck I., Hertogs K., Leonhardt H., Messens J., Conrath K. (2012) A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Arch Biochem Biophys* **526**: 114–123
- Pensec F, Marmonier A, Marchal A, Gersch S, Nassr N, Chong J, Henry M, Demangeat G & Bertsch C (2013) *Gypsophila paniculata* root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. *EPPO Bulletin* **19**: 439–445
- Petri L (1918) Nuove vedute sulle cause dell'arricciamento della vite. *Atti della Reale Accademia dei Lincei* **27**: 271–275
- Peyret H & Lomonossoff GP (2013) The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Mol Biol* **83**: 51–58
- Peyret H, Gehin A, Thuenemann EC, Blond D, Turabi El A, Beales L, Clarke D, Gilbert RJC, Fry EE, Stuart DI, Holmes K, Stonehouse NJ, Whelan M, Rosenberg W, Lomonossoff GP & Rowlands DJ (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**: e0120751
- Pia Della EA & Martinez KL (2015) Single domain antibodies as a powerful tool for high quality surface plasmon resonance studies. *PLoS One* **10**: e0124303
- Pinck L, Fuchs M, Pinck M, Ravelonandro M & Walter B (1988) A satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus* strain F13. *J Gen Virol* **69**: 233–239
- Platonova E, Winterflood CM, Junemann A, Albrecht D, Faix J & Ewers H (2015) Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods*, doi:10.1016/j.ymeth.2015.06.018
- Pollithy A, Romer T, Lang C, Muller FD, Helma J, Leonhardt H, Rothbauer U & Schuler D (2011) Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (Nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6165–6171
- 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*. *Eur J Plant Pathol* **117**: 307–312
- Pouwels J, Kornet N, van Bers N, Guighelaar T, van Lent J, Bisseling T & Wellink J (2003) Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of *Cowpea mosaic virus*. *J Gen Virol* **84**: 3485–3494
- Powel Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT & Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**: 738–743
- Prasad BVV & Schmid MF (2012) Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol*. **726**: 17–47
- Price WC (1936) Specificity of acquired immunity from tobacco ringspot diseases. *Phytopath* **26**: 665–675
- Prins M, Laimer M, Noris E, Schubert J, Wassenegger M & Tepfer M (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 73–83
- Pumplin N & Voinnet O (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* **11**: 745–760
- Pushko P, Pumpens P & Grens E (2013) Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* **56**: 141–165

Q

Quan S, Hiniker A, Collet JF, Bardwell JCA (2013) Isolation of bacteria envelope proteins, In *Methods in Molecular Biology*, pp. 359–366. Totowa, NJ: Humana Press

R

Rahbarizadeh F, Rasaei MJ, Forouzandeh M, Allameh AA (2006) Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular Immunology* **43**: 426–435

Ramsdell D C, Stace-Smith R (1979) Blueberry leaf mottle, a new disease of highbush blueberry. *Acta Hort.* **95**: 37–45

Reddy DVR, Sudarshana MR, Fuchs M, Rao NC & Thottappilly G (2009) Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Adv Virus Res.* **75**: 185–220

Reyes CA, Zanek MC & Velázquez K (2011) Generation of sweet orange transgenic lines and evaluation of citrus psorosis virus-derived resistance against Psorosis A and Psorosis B. *J Phytopathol.* **159**: 531–537

Reyes MI, Nash TE, Dallas MM, Ascencio-Ibáñez JT & Hanley-Bowdoin L (2013) Peptide aptamers that bind to geminivirus replication proteins confer a resistance phenotype to tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus infection in tomato. *J Virol.* **87**: 9691–9706

Richard G., Meyers AJ, McLean MD, Arbabi Ghahroudi M, MacKenzie R, Hall JC (2013) In vivo neutralization of α -cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody. *PLoS One.* **8**: e69495

Ritzenthaler C (2011) Parallels and distinctions in the direct cell-to-cell spread of the plant and animal viruses. *Curr Opin Virol.* **1**: 403–409

Ritzenthaler C & Hofmann C (2007) Tubule-guided movement of plant viruses. In *Viral transport in plants* pp 1–28. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

Ritzenthaler C, Laporte C, Gaire F, Dunoyer P, Schmitt-Keichinger C, Duval S, Piéquet A, Loudes AM, Rohfritsch O, Stussi-Garaud C & Pfeiffer P (2002) Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J Virol.* **76**: 8808–8819

Ritzenthaler C, Schmit AC, Michler P, Stussi-Garaud C & Pinck L (1995) Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules *in vivo*. *Mol Plant Microbe Interact.* **8**: 379–387

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

Robertson WM & Henry CE (1986) An association of carbohydrates with particles of arabis mosaic virus retained within *Xiphinema diversicaudatum*. *Ann Appl Biol.* **109**: 299–305

Rocchetti A, Hawes C & Kriechbaumer V (2014) Fluorescent labelling of the actin cytoskeleton in plants using a cameloid antibody. *Plant Methods* **10**: 12–19

Romer T, Leonhardt H & Rothbauer U (2011) Engineering antibodies and proteins for molecular *in vivo* imaging. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 882–887

Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC & Leonhardt H (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* **7**: 282–289

Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC & Leonhardt H (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* **3**: 887–889

Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso M.C, Leonhardt H (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & cellular proteomics* **7**: 282–289

Ryckaert S, Pardon E, Steyaert J, Callewaert N (2010) Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* **145**: 93–98

S

Saerens D, Muyldermans S (2012) *Single Domain Antibodies* Eds D Saerens and S Muyldermans. Totowa, NJ: Humana Press

- Saerens D, Muyldermans S, Kinne J, Bosmans E, Wernery U, Conrath K (2004) 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
- Saerens D, Pellis M, Loris R, Pardon E, Dumoulin M, Matagne A, Wyns L, Conrath K, Muyldermans S (2005) Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* **352**: 597–607
- Saerens D, Stijlemans B, Baral TN, Thi GTN, Wernery U, Magez S, De Baetselier P, Muyldermans S & Conrath K (2008) Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens. *J. Immunol. Methods* **329**: 138–150
- Safarnejad MR, Schillberg S, Jouzani GS, Tabatabaie M & Twyman RM (2011) Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnol Adv* **29**: 961–971
- Sainsbury F, Lomonosoff GP & Thuenemann EC (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* **7**: 682–693
- Saldarelli P, Dell'Orco M & Minafra A (2000) Infectious cDNA clones of two grapevine viruses. *Arch Virol* **145**: 397–405
- Sanders PR, Sammons B, Kaniewski W, Haley L, Layton J, LaVallee BJ, Delannay X & Tumer NE (1992) Field resistance of transgenic tomatoes expressing the *Tobacco mosaic virus* or *Tomato mosaic virus* coat protein genes. *Phytopathology* **82**: 683–690
- Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, van der Vlugt R & Wetzels 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
- Sanford JC & Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* **113**: 395–405
- Saunders K & Lomonosoff GP (2013) Exploiting plant virus-derived components to achieve in planta expression and for templates for synthetic biology applications. *New Phytol* **200**: 16–26
- Savastano L (1907) Note di patologia arborea. *Bull. dell'Arbroic. Italiana, Napoli XI-XXI*: 16
- Savino V, Cherif C & Martelli GP (1985) A natural serological variant of Grapevine fanleaf virus. *Phytopathologia Mediterranea* **24**: 29–34
- Saxena P, Hsieh Y-C, Alvarado VY, Sainsbury F, Saunders K, Lomonosoff GP & Scholthof HB (2011) Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmless. *Plant Biotechnol J* **9**: 703–712
- 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 β B- β C loop of the coat protein of *Grapevine fanleaf virus* is essential for transmission by the nematode *Xiphinema index*. *J. Virol.* **84**: 7924–7933
- Schellenberger P, Sauter C, Lorber B, Bron P, Trapani S, Bergdoll M, Marmonier A, Schmitt-Keichinger C, Lemaire O, Demangeat G & Ritzenthaler C (2011) Structural insights into viral determinants of nematode mediated *Grapevine fanleaf virus* transmission. *PLoS Pathog* **7**: e1002034
- Schepens B, Ibañez LI, De Baets S, Hultberg A, Bogaert P, De Bleser P, Vervalle F, Verrips T, Melero J, Vandeveldel W, Vanlandschoot P & Saelens X (2011) Nanobodies® specific for respiratory syncytial virus fusion protein protect against infection by inhibition of fusion. *J Infect Dis* **204**: 1692–1701
- Schillberg S, Zimmermann S, Zhang MY & Fischer R (2001) Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Res.* **10**: 1–12
- Schoelz JE, Harries PA & Nelson RS (2011) Intracellular transport of plant viruses: Finding the door out of the cell. *Molecular Plant* **4**: 813–831
- Scholthof HB (2006) The *Tombusvirus*-encoded P19: from irrelevance to elegance. *Nat Rev Microbiol.* **4**: 405–411
- Schorneck S, Fuchs R, Huitema E, Rothbauer U, Lipka V & Kamoun S (2009) Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody. *Plant J* **60**: 744–754
- Schotte L, Strauss M, Thys B, Halewyck H, Filman DJ, Bostina M, Hogle JM & Rombaut B (2014) Mechanism of action and capsid-stabilizing properties of VHHs with an *in vitro* antipoliioviral activity. *J Virol.* **88**: 4403–4413
- Schuster C E, Miller P W (1933) A disorder of Persian (English) walnuts grafted on black- walnut stocks, resulting in girdling. *Phytopathology* **23**:408-409.

- Schut MH, Pepers BA, Klooster R, van der Maarel SM, Khatabi el M, Verrips T, Dunnen den JT, van Ommen GJB & van Roon-Mom WMC (2014) Selection and characterization of llama single domain antibodies against N-terminal huntingtin. *Neurol Sci* **36**: 429–434
- Scorza R, Callahan A, Dardick C, Ravelonandro M, Polak J, Malinowski T, Zagrai I, Cambra M & Kamenova I (2013) Genetic engineering of Plum pox virus resistance: ‘HoneySweet’ plum—from concept to product. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **115**: 1–12
- Seppänen P, Puska R, Honkanen J, Tyulkina LG, Fedorkin O, Morozov SYu & Atabekov JG (1997) Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J Gen Virol* **78**: 1241–1246
- Serghini MA, 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
- Shao CY, Secombes CJ & Porter AJ (2007) Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Mol Immunol* **44**: 656–665
- Sherwood LJ & Hayhurst A (2012) Hapten mediated display and pairing of recombinant antibodies accelerates assay assembly for biothreat countermeasures. *Sci Rep.* **2**: 807–818
- Sherwood LJ & Hayhurst A (2013) Ebola virus Nucleoprotein C-Termini Potently Attract Single Domain Antibodies Enabling Monoclonal Affinity Reagent Sandwich Assay (MARSA) Formulation. *PLoS ONE* **8**: e61232
- Shkoporov AN, Khokhlova EV, Savochkin KA, Kafarskaya LI & Efimov BA (2015) Production of biologically active scFv and VHH antibody fragments in *Bifidobacterium longum*. *FEMS Microbiol Lett* **362**: DOI: 10.1093/femsle/fnv083
- Siddiqui SA, Sarmiento C, Truve E, Lehto H & Lehto K (2008) Phenotypes and Functional Effects Caused by Various Viral RNA Silencing Suppressors in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 178–187
- Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M & Burgyán J (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070–3080
- Simón-Mateo C & García JA (2011) Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochim Biophys Acta* **1809**: 722–731
- Siontorou CG (2013) Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine* **8**: 4215–4227
- Skerra A & Schmidt TG (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Meth. Enzymol.* **326**: 271–304
- Skottrup PD, Leonard P, Kaczmarek JZ, Veillard F, Enghild JJ, O’Kennedy R, Sroka A, Clausen RP, Potempa J & Riise E (2011) Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from *Porphyromonas gingivalis*. *Anal Biochem* **415**: 158–167
- Smith G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317
- Smith KM & Markham R (1944) Two new viruses affecting Tobacco and other plants. *Phytopathology* **34**: 324–329
- Smith KM (1946) Tomato blackring: a new virus disease. *Parasitology* **37**:126–130.
- Smolarek D, Bertrand O & Czerwinski M (2012) Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine? *Postepy Hig Med Dosw* **66**: 348–358
- Sokhandan-Bashir N & Melcher U (2012) Population genetic analysis of grapevine fanleaf virus. *Arch Virol.* **157**: 1919–1929
- Souza AJ de, Mendes BMJ & Mourão Filho F de AA (2007) Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. *Sci Agric* **64**: 645–656
- Souza MT, Tennant PF & Gonsalves D (2005) Influence of coat protein transgene copy number on resistance in transgenic line 63-1 against Papaya ringspot virus isolates. *HortScience* **40**: 2083–2087
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A & Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* **1**: 2019–2025
- Spassova MI, Prins TW, Folkertsma RT, Klein-Lankhorst RM, Hille J, Goldbach RW & Prins M (2001) The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* **7**: 151–161

- Spinelli S, Frenken LGJ, Hermans P, Verrips T, Brown K, Tegoni M, Cambillau C (2000) Camelid Heavy-Chain Variable Domains Provide Efficient Combining Sites to Haptens. *Biochemistry* **39**: 1217–1222
- Steiner D, Forrer P, Stumpp MT, Plückthun A (2006) Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nature Biotechnology* **24**: 823–831
- Stellmach G, Bercks R (1963) Untersuchungen an Rebevirose: Nachweis des Tomatenschwarzringflecken-Virus (*Tomato blackring virus*) in kranken Stöcken der Sorte Aramon × Riparia 143 A M. G. (Amerikanerrebe) *J Phytopathol* **48**: 200–202
- Stijlemans B, Muyldermans S, Caljon G, Natesan SKA, Saerens D, Conrath K, Pérez-Morga D, Skepper JN, Nikolaou A, Brys L, Pays E, Magez S, Field MC & de Baetselier P (2011) High affinity nanobodies against the *Trypanosome brucei* VSG are potent trypanolytic agents that block endocytosis. *PLoS Pathog* **7**: e1002072
- Strokappe N, Szynol A, Aasa-Chapman M, Gorlani A, Forsman Quigley A, Hulsik DL, Chen L, Weiss R, de Haard H & Verrips T (2012) Llama antibody fragments recognizing various epitopes of the CD4bs neutralize a broad range of HIV-1 subtypes A, B and C. *PLoS One* **7**: e33298
- Stumpp MT & Amstutz P (2007) DARPins: a true alternative to antibodies. *Curr Opin Drug Discov Devel* **10**: 153–159
- Swain MD, Anderson GP, Serrano-González J, Liu JL, Zabetakis D & Goldman ER (2011) Immunodiagnostic reagents using llama single domain antibody-alkaline phosphatase fusion proteins. *Anal Biochem* **417**: 188–194
- Szittyá G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* **22**: 633–640
- Szynol A, de Soet JJ, Sieben-van Tuyl E, Bos JW & Frenken LG (2004) Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3390–3395

T

- Takahashi T, Sugawara T, Yamatsuta T, Isogai M, Natsuaki T & Yoshikawa N (2007) Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. *Phytopathology* **97**: 1200–1206
- Tarr AW, Lafaye P, Meredith L, Damier-Piolle L, Urbanowicz RA, Meola A, Jestin JL, Brown RJP, McKeating JA, Rey FA, Ball JK & Krey T (2013) An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* **58**: 932–939
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A & Galeffi P (1993) Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**: 469–472
- Taylor CE & Brown DJF (1997) Nematode vectors of plant viruses. CAB International, Wallingford, UK
- Taylor CE & Robertson WM (1970) Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors, *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X. index* (Thorne and Allen). *Ann Appl Biol* **66**: 375–380
- Teh Y-HA & Kavanagh TA (2009) High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic Res* **19**: 575–586
- Terlizzi F, Pisi A, Beber R, Fiore N, Zamorano A, Credi R & Ratti C (2014) Genetic variability of the movement and coat protein genes of Grapevine fanleaf virus isolates from Italy. *J Gen Plant Pathol* **81**: 63–67
- The Commission of the European Communities (2007) Commission Decision of 20 September 2007 concerning the non-inclusion of 1,3-dichloropropene in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance
- The Council of the European Union (2003) Council Decision of 18 March 2003 concerning the non-inclusion of aldicarb in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance
- Thomas CL, Bayer EM, Ritzenthaler C, Fernandez-Calvino L & Maule AJ (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *Plos Biol* **6**: e7
- Thomassen Y.E., Meijer W., Sierkstra L., Verrips C.T. (2002) Large-scale production of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 273–278
- Tillib S.V., Vyatchanin A.S., Muyldermans S. (2014) Molecular analysis of heavy chain-only antibodies of *Camelus bactrianus*. *Biochemistry (Moscow)* **79**: 1382–1390
- Tilsner J (2015) Techniques for RNA in vivo imaging in plants. *J Microsc* **258**: 1–5

- Tilsner JJ & Oparka KJK (2010) Tracking the green invaders: advances in imaging virus infection in plants. *Biochem J* **430**: 21–37
- Tokuhara D, Álvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, Kuroda M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nochi T, Sagara H, Aladin F, Marcotte H, Frenken LGJ, Iturriza-Gómara M, Kiyono H, Hammarström L & Yuki Y (2013) Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest* **123**: 3829–3838
- Tricoli DM, Carney KJ, Russell PF, McMaster JR, Groff DW, Hadden KC, Himmel PT, Hubbard JP, Boeshore ML & Quemada HD (1995) Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Nat Biotechnol* **13**: 1458–1465
- Truve E, Ilu AAO, Honkanen J, Puska R, Mehto M, Hassi A, Teeri TH, Kelve M, nen PSA & Saarma M (1993) Transgenic potato plants expressing mammalian 2'–5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Nat Biotechnol* **11**: 1048–1052
- Tu Z, Xu Y, He Q, Fu J, Liu X, Tao Y (2012) Isolation and characterisation of deoxynivalenol affinity binders from a phage display library based on single-domain camelid heavy chain antibodies (VHHs). *Food and Agricultural Immunology* **23**: 123–131
- Turner KB, Liu JL, Zabetakis D, Lee AB, Anderson GP & Goldman ER (2015) Improving the biophysical properties of anti-ricin single-domain antibodies. *Biotechnology Reports* **6**: 27–35

U

- Uyemoto J K, Taschenberg E F, Hummer D K (1977) Isolation and identification of a strain of *Grapevine Bulgarian latent virus* in concord grapevine in New York State. *Plant Disease Reporter* **61**: 949–953.
- Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazeveille C, Cot D & Blanc S (2010) The 'acrostyle': a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* **39**: 221–229
- Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hébrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A & Blanc S (2007) A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 17959–17964

V

- Valat L, Burrus M, Fuchs M & Mauro M-C (2003) Review of techniques to inoculate grapevines with *Grapevine fanleaf virus*: lessons and perspectives. *Am J Enol Vitic* **54**: 279–285
- Valat L, Fuchs M & Burrus M (2006) Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of *Grapevine fanleaf virus*: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Sci* **170**: 739–747
- Valat L, Mode F, Mauro MC & Burrus M (2003) Preliminary attempts to biolistic inoculation of *Grapevine fanleaf virus*. *J Virol Methods* **108**: 29–40
- Valentine TA, Roberts IM & Oparka KJ (2002) Inhibition of tobacco mosaic virus replication in lateral roots is dependent on an activated meristem-derived signal. *Protoplasma* **219**: 184–196
- Van Damme EJM, Hao Q, Chen Y, Barre A, Vandebussche F, Desmyter S, Rougé P & Peumans WJ (2001) Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rev Plant Sci* **20**: 395–465
- Van de Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, Gijs H-L, Jans K, Lagae L, Muyldermans S, Maes G & Borghs G (2011) Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS Nano* **5**: 4319–4328
- van Lent JWM & Schmitt-Keichinger C (2006) Viral movement proteins induce tubule formation in plant and insect cells *In Cell-cell channels*, pp160-175 Springer New York
- Van Overbeke W, Wongsantichon J, Everaert I, Verhelle A, Zwaenepoel O, Loonchanta A, Burtnick LD, De Ganck A, Hochepped T, Haigh J, Cuvelier C, Derave W, Robinson RC & Gettemans J (2015) An ER-directed gelsolin nanobody targets the first step in amyloid formation in a gelsolin amyloidosis mouse model. *Hum Mol Genet* **24**: 2492–2507
- Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, Van Huysse J, Demetter P, Steidler L, Remaut E, Cuvelier C & Rottiers P (2009) Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol* **3**: 49–56

- Vaneycken I, D'huyvetter M, Hernot S, De Vos J, Xavier C, Devoogdt N, Caveliers V & Lahoutte T (2011) Immunomaging using nanobodies. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 877–881
- Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, Ibañez LI, Schepens B, Depla E & Saelens X (2011) Nanobodies®: New ammunition to battle viruses. *Antiviral Res* **92**: 389–407
- Vasudevan A, Oh TK, Park JS, Lakshmi SV, Choi BK, Kim SH, Lee HJ, Ji J, Kim JH, Ganapathi A, Kim SC & Choi CW (2008) Characterization of resistance mechanism in transgenic *Nicotiana benthamiana* containing Turnip crinkle virus coat protein. *Plant Cell Rep* **27**: 1731–1740
- Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Gómez-Sebastián S, Nuñez C, Alvarado C, Lasa R, Escribano JM, Garaicoechea LL, Fernandez F, Bok K, Wigdorovitz A, Saif LJ & Parreño V (2013) Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to Rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against Human Rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathog* **9**: e1003334
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, et al (2007) A High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* **2**: e1326–18
- Verchot-Lubicz J, Torrance L, Solovyev AG, Morozov SY, Jackson AO & Gilmer D (2010) Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block–Encoding Viruses. *Mol. Plant Microbe Interact* **23**: 1231–1247
- 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, Gottula J, Schmitt-Keichinger C, Komar V, Ackerer L, Belval L, Rakotomalala L, Lemaire O, Ritzenthaler C & Fuchs M (2013) 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
- Vigne E, Komar V & Fuchs M (2004) Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus*. *Transgenic Res.* **13**: 165–179
- 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
- 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 Res* **144**: 154–162
- Villani ME, Di Carli M, Donini M, Traversini G, Lico C, Franconi R, Benvenuto E & Desiderio A (2008) Validation of a stable recombinant antibodies repertoire for the direct selection of functional intracellular reagents. *J Immunol Methods* **329**: 11–20
- Villani ME, Roggero P, Bitti O, Benvenuto E & Franconi R (2005) Immunomodulation of *Cucumber mosaic virus* infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library. *Plant Mol Biol* **58**: 305–316
- Villate L, Fievet V, Hanse B, Delemarre F, Plantard O, Esmenjaud D & van Helden M (2008) Spatial distribution of the dagger nematode *Xiphinema index* and its associated *Grapevine fanleaf virus* in French vineyard. *Phytopathology* **98**: 942–948
- Villate L, Morin E, Demangeat G, Van Helden M & Esmenjaud D (2012) Control of *Xiphinema index* populations by fallow plants under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* **102**: 627–634
- Vincke C, Gutiérrez C, Wernery U, Devoogdt N, Hassanzadeh-Ghassabeh G & Muyldermans S (2012) Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods Mol Biol* **907**: 145–176
- Vincke C, Muyldermans S (2012) Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies, In *Single Domain Antibodies*, *Methods Mol Biol* pp. 15–26. Totowa, NJ: Humana Press
- Virdi V, Coddens A, De Buck S, Millet S, Goddeeris BM, Cox E, De Greve H, Depicker A (2013) Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. - PubMed - NCBI. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 11809–11814
- Viry M, Serghini MA, 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
- Visintin M, Quondam M & Cattaneo A (2004) The intracellular antibody capture technology: towards the high-throughput selection of functional intracellular antibodies for target validation. *Methods* **34**: 200–214

- Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch HJ, Liao YC, Kreuzaler F & Fischer R (1995) Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Molecular Breeding* **1**: 39–50
- Vuittenez A, Legin R & Kuszala J (1969) Les viroses de la vigne. Les maladies des plantes. In Journées françaises d'étude et d'information, Paris, 5-7 février 1969 *Acta* pp 557-77
- Vuorinen AL, Kelloniemi J & Valkonen JPT (2011) Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci* **181**: 355–363

W

- Walper SA, Battle SR, Audrey Brozozog-Lee P, Zabetakis D, Turner KB, Buckley PE, Calm AM, Welsh HS, Warner CR, Zacharko MA, Goldman ER & Anderson GP (2014a) Thermostable single domain antibody–maltose binding protein fusion for *Bacillus anthracis* spore protein BclA detection. *Anal Biochem* **447**: 64–73
- Walper SA, Lee P, Anderson G & Goldman E (2013) Selection and characterization of single domain antibodies specific for *Bacillus anthracis* spore proteins. *Antibodies* **2**: 152–167
- Walper SA, Liu JL, Zabetakis D, Anderson GP & Goldman ER (2014b) Development and evaluation of single domain antibodies for vaccinia and the L1 antigen. *PLoS One* **9**: e106263
- Walter B (1988) Quelques exemples de la réaction physiologique de la vigne en présence de virus. *Bulletin de l'OIV* **61**: 383–390
- Wang J, Bever CRS, Majkova Z, Dechant JE, Yang J, Gee SJ, Xu T & Hammock BD (2014) Heterologous antigen selection of camelid heavy chain single domain antibodies against tetrabromobisphenol A. *Anal Chem* **86**: 8296–8302
- Wang M-B, Masuta C, Smith NA & Shimura H (2012) RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 1275–1285
- Wang RY-L, Stork J & Nagy PD (2009) A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. *J Virol* **83**: 3276–3287
- Wang S, Gergerich RC, Wickizer SL & Kim KS (2002) Localization of Transmissible and Nontransmissible Viruses in the Vector Nematode *Xiphinema americanum*. *Phytopathology* **92**: 646–653
- Watanabe Y, Ogawa T, Takahashi H, Ishida I, Takeuchi Y, Yamamoto M & Okada Y (1995) Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Lett* **372**: 165–168
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauherhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F & Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* **198**: 157–174
- Wetzel T & Krczal G (2007) Molecular biology of *Raspberry ringspot nepovirus*. *Plant Viruses* **1**: 45–51
- Wetzel T, Chisholm J, Dupuis-Maguiraga L, Bassler A & Sanfacon H (2013) *In vitro* and *in vivo* evidence for differences in the protease activity of two arabis mosaic nepovirus isolates and their impact on the infectivity of chimeric cDNA clones. *Virology* **446**: 102–111
- Whitham S, McCormick S & Baker B (1996) The N gene of tobacco confers resistance to *Tobacco mosaic virus* in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8776–8781
- Wintermantel WM, Banerjee N, Oliver JC, Paolillo DJ & Zaitlin M (1997) Cucumber mosaic virus is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology* **231**: 248–257

X

- Xu Y, Xiong L, Li Y, Xiong Y, Tu Z, Fu J & Tang X (2015) Citrinin detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry. *Food Chem* **177**: 97–101

Y

- Yan J, Li G, Hu Y, Ou W & Wan Y (2014) Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med* **12**: 1–12
- Yan J, Wang P, Zhu M, Li G, Romão E, Xiong S & Wan Y (2015) Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *Journal of Nanobiotechnology* **13**: 33

- Yang S, Shang Y, Di Wang, Yin S, Cai J & Liu X (2015) Diagnosis of porcine circovirus type 2 infection with a combination of immunomagnetic beads, single-domain antibody, and fluorescent quantum dot probes. *Arch Virol* doi 10.1007/s00705-015-2508-x
- Yobrégat O (2014) Un retour historique et critique sur une ancienne maladie émergente : le court-noué de la vigne. <http://www.vignevin-sudouest.com/publications/itv-colloque/2ndes-assises-vins-sud-ouest/documents/historique-court-noue.pdf>

Z

- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Montagu MV & Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**: 2143–2150
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L & García ML (2008) Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep* **27**: 57–66
- Zarghani SN, Shams-Bakhsh M, Bashir NS & Wetzel T (2013) Molecular characterization of whole genomic RNA2 from iranian isolates of *Grapevine Fanleaf Virus*. *J Phytopathol* **161**: 419–425
- Zarschler K., Witcey S., Kapplusch F., Foerster C., Stephan H. (2013) High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **12**: 97
- Zhang MY, Zimmermann S, Fischer R & Schillberg S (2008) Generation and evaluation of movement protein-specific single-chain antibodies for delaying symptoms of Tomato spotted wilt virus infection in tobacco. *Plant Pathol* **57**: 854–860
- Zhang X, Li H, Zhang J, Zhang C, Gong P, Ziaf K, Xiao F & Ye Z (2010) Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Res* **20**: 569–581
- Zhao F, Hwang US, Lim S, Yoo RH, Igori D, Lee S-H, Lim H-S & Moon JS (2015) Complete genome sequence and construction of infectious full-length cDNA clones of tobacco ringspot Nepovirus, a viral pathogen causing bud blight in soybean. *Virus Genes* **51**: 163–166
- Zhu M, Gong X, Hu Y, Ou W & Wan Y (2014) Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *J Transl Med* **12**: 352–361
- Zhu M., Hu Y., Li G., Ou W., Mao P., Xin S., Wan Y. (2014) Combining magnetic nanoparticle with biotinylated nanobodies for rapid and sensitive detection of influenza H3N2. *Nanoscale Res Lett* **9**: 528
- Ziegler A & Torrance L (2002) Applications of recombinant antibodies in plant pathology. *Mol Plant Pathol* **3**: 401–407
- Ziegler-Graff V, Guilford PJ & Baulcombe DC (1991) Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* **182**: 145–155
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao Y-C & Fisher R (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding* **4**: 369–379

Contributions

Ce mémoire, comme tout travail de thèse, n'est pas le fruit du labeur d'une seule personne, mais au contraire rapporte les résultats générés grâce au travail collaboratif réalisé au sein d'une équipe et au-delà. Il est actuellement d'usage, pour une publication scientifique, d'indiquer la contribution réelle de chaque intervenant, mais à défaut d'y être parvenue rigoureusement tout au long du texte, le tableau ci-après détaille, la participation directe et active de chacun à ce projet.

Financeurs

Région Alsace

Demi-bourse de 3 ans de contrat de thèse

Institut national de la recherche agronomique (Inra)

Demi-bourse de 3 ans de contrat de thèse

Comité interprofessionnel des vins de Bourgogne (BIVB)

Prolongation de 6 mois de contrat de thèse et obtention des Nb

Comité interprofessionnel des vins d'Alsace (CIVA)

Prolongation de 6 mois de contrat de thèse et obtention des Nb

Comité interprofessionnel des vins de Champagne (CIVC)

Prolongation de 6 mois de contrat de thèse et obtention des Nb

Bureau interprofessionnel des vins de Bordeaux (CIVB)

Participation aux frais de fonctionnement

Projet Interreg Rhin Supérieur BACCHUS

Participation aux frais de fonctionnement

Institut de biologie moléculaire des plantes du CNRS, STRASBOURG

Léa ACKERER (Doctorante CIFRE IFV/Inra/IBMP, 2012-2015)

Application des Nanobodies au diagnostic par ELISA du court-noué de la vigne

Purification du Nb23 pour la Cryo-EM

Expérimentations de *Dynamic Light Scattering* (DLS)

Détermination des prérequis nécessaires à l'étude structurale des Nanobodies

Nicolas BAUMBERGER (Ingénieur de recherche)

Expertise technique pour la purification des Nanobodies

François BERTHOLD (Doctorant MENESR, 2011-2015)

Expertise technique pour la microscopie

Arnaud GELB (Stagiaire Master1, été 2012)

Participation à la caractérisation des lignées transgéniques T1

Kamal HLEIBIEH (Post-doctorant, Programme Interreg Bacchus 2012?-2014 et ANR COMBiNiNG 2015-2016)

Application des Nanobodies au suivi du GFLV *in vivo* dans *N. benthamiana* et *X. index*

Génération de lignées de *N. benthamiana* transgéniques exprimant le Nb122:TRFP et le Nbp59:TRFP

Expérimentations de *biosensing* avec les lignées 122TR et p59TR

Extraction d'ARN pour la caractérisation par RT-qPCR des lignées transgéniques T2

Contributions

Caroline HEMMER (Doctorante Région Alsace/Inra, 2010-2014)

- Gestion scientifique et technique du projet
- Encadrement des stagiaires
- Exploitation et interprétation des résultats de l'ensemble des expérimentations
- Valorisation des résultats pour publications
- Création des banques, obtention, purification et caractérisation préliminaire des Nanobodies anti-GFLV
- Génération et caractérisation des lignées de *N. benthamiana* transgéniques exprimant le Nb23:EGFP
- Identification de mutants de contournement
- Expérimentations de *biosensing* avec les lignées 23EG
- Purifications du GFLV-F13, -TD et -G2 et de l'ArMV-S

Corinne KEICHINGER (Maître de conférences Université de Strasbourg)

- Suivi scientifique du projet
- Correction du manuscrit
- Construction du virus synthétique GFLV-CP+3
- Expérimentations pour l'étude du mécanisme de la résistance induite par le Nb23

Rémi MAGLIONE (Stagiaire Master1, été 2012)

- Participation à la caractérisation des lignées transgéniques T0 et T1

Bhaskar MITRA (Stagiaire, été 2012)

- Participation à la caractérisation des lignées transgéniques T0 et T1

Baptiste MONSION (Post-doctorant, 2012-2015)

- Relecture critique du manuscrit

Carole PFISTER (Stagiaire Master1, hiver 2013)

- Extraction d'ARN pour la caractérisation par RT-qPCR des lignées transgéniques T1

Christophe RITZENTHALER (Directeur de recherche)

- Conception et direction scientifique du projet
- Valorisation des résultats pour publications
- Relecture critique du manuscrit

François SEMENT (Post-doctorant, Automne 2012)

- Déterminations des conditions pour la caractérisation par RT-qPCR des lignées transgéniques

Plateforme de production végétale

- Aide à la gestion du matériel végétal

Centre de recherche de l'Inra, COLMAR

Lorène BELVAL (Doctorante MENESR, 2011-2015)

- Expérimentations d'ISEM

Gérard DEMANGEAT (Ingénieur de recherche)

- Suivi scientifique du projet
- Relecture critique du manuscrit
- Production et gestion des populations de *X. index* avirulifères et virulifères
- Tests de transmission et d'inoculation par nématodes.
- Purification du GFLV-F13 pour la Cryo-EM

Samia DJENANNE (Ingénieur de recherche)

- Application à la vigne de la résistance induite par le Nb23

Sophie GERSCH (Technicienne)

- Tests de transmission et d'inoculation par nématodes

Véronique KOMAR (Technicienne)

- Purification du GFLV-F13 pour l'immunisation, du GFLV-TD, GFLV-G2 et GFLV-GHu et de l'ArMV-S
- Expérimentations de recherche du spectre de résistance des lignées 23EG16-9 et 23EG38-4

Expérimentations de challenge avec une forte pression d'inoculum et avec de l'ARN viral
Identification de mutants de contournement

Aurélie MARMONIER (Assistant ingénieur)

Production et gestion des populations de *X. index* avirulifères et virulifères

Tests de transmission et d'inoculation par nématodes

Expérimentations d'immunomarquage du GFLV dans *X. index*

Expérimentations de recherche du spectre de résistance des lignées 23EG16-9 et 23EG38-4

Détermination de l'affinité relative du Nb23 envers les mutants GFLV-Y₂₁₆H et -F₅₀₂L

Identification de mutants de contournement

Emmanuelle VIGNE (Ingénieur d'étude)

Expérimentations de recherche du spectre de résistance des lignées 23EG16-9 et 23EG38-4

Expérimentations de challenge avec une forte pression d'inoculum et avec de l'ARN viral

Identification de mutants de contournement

Service d'expérimentation agronomique et viticole

Production et gestion du matériel végétal

Vrije Universiteit Brussel, VUB et Nanobody Service Facility, NSF, BRUXELLES, Belgique

Gholamreza HASSANZADEH GHASSABEH (Responsable du NSF)

Expertise technique pour la création des banques de Nanobodies

Jan VAN GOMPEL (Technicien)

Expertise technique pour la création des banques de Nanobodies

Serge MUYLDERMANS (Professeur)

Expertise scientifique pour les Nanobodies

Institut de génétique et de biologie moléculaire (IGBMC), CNRS-Inserm, ILLKIRCH

Bruno KLAHOLZ (Directeur de recherche)

Expertise scientifique pour l'étude structurale par cryo-EM des Nanobodies

Valorisation des résultats pour publication

Igor ORLOV (Post-doctorant, ANR COMBiNiNG 2015)

Obtention de la structure du complexe Nb23/GFLV par cryo-EM

Institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC), CNRS, STRASBOURG

Bernard LORBER (Chargé de recherche)

Expertise scientifique pour les expérimentations de DLS et l'étude structurale des Nanobodies

Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin, MADISON, États-Unis

Jean-Yves SGRO (*Senior Scientist*)

Élaboration de la carte RIVEM du GFLV

Odile HEMMER

Relecture linguistique et stylistique du manuscrit

Caroline HEMMER

Développement et utilisation de Nanobodies dirigés contre le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) en lutte antivirale et comme biocapteur *in planta*

Résumé

Par leur stabilité, leur petite taille et leur nature monomérique, les domaines variables des immunoglobulines à chaînes lourdes, ou Nanobodies (Nb), sont incontournables en diagnostic et recherche médicale. Pourtant, leur utilisation en agro-biotechnologies demeure confidentielle.

Dans l'idée de les utiliser pour étudier et combattre le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), responsable de la maladie du court-noué très préjudiciable à l'économie viticole mondiale, j'ai produit une collection de Nb spécifiques du GFLV.

Fusionné à une protéine fluorescente et exprimé en plante de façon stable, un de ces Nb (alors appelé Chromobody, Cb) a conféré une haute résistance au GFLV inoculé mécaniquement ou transmis par nématodes.

Le potentiel du Cb comme biocapteur a été validé par le suivi *in vivo* d'un isolat contournant la résistance mais toujours reconnu par le Cb.

La structure du complexe Nb/GFLV a été résolue à 2,8 Å et révèle la zone occupée par le Nb à la surface de la capsid.

Ces résultats ouvrent des perspectives innovantes pour la compréhension du cycle infectieux d'un phytovirus et l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte antivirale.

Mots-clés : anticorps simple domaine, HCAb, Nanobody, résistance induite, GFLV, népovirus, transmission, Chromobody, suivi dynamique *in vivo*

Abstract

Due to their small size, high stability and strict monomeric nature, Nanobodies (Nbs) deriving from camelids heavy chain only antibodies have proven very valuable as diagnostic and therapeutic tools. However their use in agro biotechnology remains limited.

In order to apply Nbs to the study and the control of grapevine fanleaf degeneration, I produced a collection of Nbs against *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), the causal agent of this devastating disease worldwide.

When fused to a fluorescent protein and stably expressed in plants, one of these Nbs (called Chromobody, Cb) conferred high resistance to GFLV, whether inoculated mechanically or by vector-mediated transmission.

The identification of an isolate overcoming the resistance but still bound by the Cb allowed real-time tracking of the infection showing the high potential of Cbs as biosensors.

The cryoEM structure of the Nb/GFLV complex was obtained at 2,8 Å and provides a clear picture of the footprint of the Nb on the surface of the GFLV capsid.

These results pave the way for the innovative use of Nbs to unravel viral life cycle and to counter viral diseases.

Keywords: single domain antibody, HCAb, Nanobody, engineered resistance, GFLV, nepovirus, transmission, Chromobody, live cell tracking