



HAL
open science

De la paire de bottes à la paire de bases : de l'intérêt d'étudier l'écologie des viromes de plantes

François Maclot, Thierry T. Candresse, Denis Filloux, Philippe Rott, Carolyn Malmstrom, René van Der Vlugt, Sébastien Massart, Philippe Roumagnac

► To cite this version:

François Maclot, Thierry T. Candresse, Denis Filloux, Philippe Rott, Carolyn Malmstrom, et al.. De la paire de bottes à la paire de bases : de l'intérêt d'étudier l'écologie des viromes de plantes. *Virologie*, 2021, 25 (1), pp.29-42. 10.1684/vir.2021.0879 . hal-03162172

HAL Id: hal-03162172

<https://hal.inrae.fr/hal-03162172>

Submitted on 26 Aug 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

De la paire de bottes à la paire de bases : de l'intérêt d'étudier l'écologie des viromes de plantes

François Maclot¹, Thierry Candresse², Denis Filloux^{3,4}, Philippe Rott^{3,4}, Carolyn Malmstrom⁵, René van der Vlugt⁶, Sébastien Massart^{1*}, Philippe Roumagnac^{3,4*}

* Ces deux auteurs ont contribué de manière équivalente à cette publication.

¹ *Plant Pathology Laboratory, Terra-Gembloux Agro-Bio Tech, Liège University, Gembloux, Belgium*

² *UMR Biologie du Fruit et Pathologie, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement, Bordeaux University, Bordeaux, France*

³ *CIRAD, BGPI, Montpellier, France*

⁴ *BGPI, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, L'Institut Agro, Montpellier, France*

⁵ *Department of Plant Biology and Graduate Program in Ecology, Evolution, & Behavior, Michigan State University, East Lansing, MI, United States*

⁶ *Wageningen University and Research, Wageningen, Netherlands*

Correspondances : Sébastien Massart (sebastien.massart@uliege.be), Philippe Roumagnac (philippe.roumagnac@cirad.fr)

Résumé

L'écologie des virus végétaux a commencé à être explorée à la fin du XIXe siècle. Depuis lors, des avancées majeures ont mis en évidence de complexes interactions virus-hôte-vecteur dans des environnements variés. Ces progrès ont été accélérés par de nouvelles technologies de détection et de caractérisation des virus, dont la dernière en date est le séquençage à haut débit (HTS). Les technologies HTS permettent, pour la première fois, de caractériser sans information préalable le virome, c'est à dire l'ensemble des virus présents dans un échantillon. Ces travaux de phytovirologie basés sur les technologies HTS ont récemment produit d'importants résultats. A titre d'exemples, on peut citer la mise en évidence des influences réciproques entre la dynamique des phytovirus et la structure des communautés hôtes multi-espèces ou des effets de la simplification des écosystèmes causés par les activités humaines sur la biodiversité et l'émergence de nouveaux virus dans les cultures. Cependant, pour être efficaces les études de phytovirologie doivent surmonter des défis à chaque étape de la procédure, depuis l'échantillonnage des plantes jusqu'aux analyses bio-informatiques. Cette revue résume tout d'abord les progrès historiques majeurs de l'écologie des virus végétaux réalisés en association avec les développements technologiques, puis précise les éléments clés à considérer pour tenter de se projeter à court terme vers des études sans a priori d'écologie des communautés virales.

Mots-clés : Ecologie des virus de plantes et évolution, Phytovirome, Métagénomique, Nouvelles générations de séquençage, Séquençage haut-débit (HTS), Avancées historiques, Opportunités et défis.

41 From boots on the ground to nucleotides in the
42 sequencer: a century of advances in the study of the
43 plant virus ecology

44

45 **Abstract**

46 Plant virus ecology began to be explored at the end of the 19th century. Since then, major advances have
47 revealed complex virus–host–vector interactions in a variety of environments. These advances have
48 been accelerated by development of new technologies for virus detection and characterization, the latest
49 of which being high-throughput sequencing (HTS). HTS technologies have proved to be effective for
50 non-targeted characterization of all or nearly all viruses present in a sample without requiring prior
51 information about virus identity, as would be needed for virus-targeted tests. Phytoviromic studies have
52 thus made important advances, including characterization of the complex interactions between
53 phytovirus dynamics and the structure of multi-species host communities, and documentation of the
54 effects of anthropogenic ecosystem simplification on plant virus emergence and diversity. However,
55 such studies must overcome challenges at every stage, from plant sampling to bioinformatics analysis.
56 This review summarizes major advances in plant virus ecology, in association with technological
57 developments, and presents key considerations for use of HTS in the study of the ecology of phytovirus
58 communities.

59

60 **Keywords:** Ecology and evolution of plant viruses, Phytovirome, Metagenomics, Next generation
61 sequencing, High-throughput sequencing (HTS), Opportunities and challenges.

62

63

64 1. Pourquoi étudier l'écologie des virus des plantes ?

65

66 La pandémie mondiale liée au SARS-CoV-2 a révélé les faiblesses de nos connaissances actuelles en
 67 écologie virale [1]. On peut tout particulièrement souligner la difficulté voire l'impossibilité d'identifier
 68 clairement l'hôte primaire du SARS-CoV-2, la méconnaissance générale de la diversité des coronavirus
 69 à l'échelle des écosystèmes sauvages, et le manque d'informations précises sur les mécanismes
 70 écologiques et évolutifs à l'œuvre lors de l'émergence de virus tels que le SARS-CoV-2. Nous devons
 71 donc collectivement tirer les leçons de cette pandémie et retrouver le chemin du terrain afin de produire
 72 des connaissances en écologie virale. Ce constat en virologie humaine et animale s'applique tout autant
 73 à la virologie végétale, même si depuis quelques années s'exprime un regain d'intérêt pour l'étude de
 74 l'écologie des virus de plantes [2–4]. Bien qu'encore minoritaires, ces travaux s'appuient sur
 75 l'amélioration continue des technologies de séquençage dites à haut débit et des capacités de traitement
 76 bio-informatique des énormes jeux de données ainsi générés.

77 Le domaine de l'écologie des phytovirus examine les interactions complexes entre les virus associés aux
 78 plantes, leurs hôtes, leurs vecteurs, ainsi que les environnements dans lesquels ils interagissent (Figure
 79 1), élargissant ainsi la perspective de l'épidémiologie virale [5]. Traditionnellement, celle-ci étudie les
 80 maladies et les facteurs qui influencent leur propagation ainsi que la dynamique des populations virales.
 81 De façon complémentaire, l'écologie des virus végétaux élargit le champ d'étude pour inclure la
 82 compréhension des profils de distribution et de la dynamique des phytovirus dans un environnement
 83 donné, leurs effets sur les propriétés des communautés d'hôtes végétaux et des écosystèmes, et les effets
 84 réciproques de l'environnement sur la dynamique et l'évolution des phytovirus [4,6,7].

85 L'écologie des phytovirus s'appuie sur diverses disciplines, comme la virologie, l'écologie,
 86 l'épidémiologie, la biologie végétale et l'entomologie [8]. L'étude des virus nécessite des méthodes et
 87 des outils hautement spécialisés, ce qui explique pourquoi les écologues ont d'abord concentré leurs
 88 efforts sur des organismes plus facilement observables et pourquoi l'histoire de l'écologie des virus de
 89 plantes a été largement influencée par les développements technologiques. Nous présenterons dans la
 90 première partie de cette revue les avancées en écologie virale végétale réalisées durant le XX^{ème} siècle
 91 puis, dans la deuxième partie, nous nous focaliserons sur les opportunités et les défis associés aux
 92 travaux prometteurs de métagénomique virale développés depuis environ deux décennies. Tout au long
 93 de cette revue, nous montrerons que la virologie végétale a toujours joué un rôle majeur pour la virologie
 94 en général, notamment au travers de découvertes marquantes : découverte du premier virus, première
 95 cristallisation de virus, première visualisation d'un virus en microscopie électronique, démonstration de
 96 l'infectivité de l'ARN viral, mécanisme du « *RNA silencing* », etc. [9]. Nous verrons également, qu'au
 97 travers des études menées en écologie virale, la virologie végétale continue de produire des concepts,
 98 des outils et des résultats de grand intérêt pour les modèles animaux.

99

100 2. La virologie des plantes à l'avant-garde des découvertes en

101 écologie virale au début du XX^e siècle

102

103 La première évocation écrite de symptômes viraux chez les plantes, probablement causés par un
 104 géminivirus (*Eupatorium yellow-vein virus*) a été rédigée au Japon, il y a plus de 1200 ans. En effet,
 105 dans le *Man'yoshu*, première anthologie de poésie japonaise, un poème attribué à l'impératrice Koken et
 106 rédigé au cours de l'été 752 après J.-C., décrit l'apparition automnale de jaunissement de feuilles d'une
 107 eupatoire, *Eupatorium lindleyanum* [10,11]. Environ un millénaire plus tard, Charles de L'Écluse
 108 observe des tulipes aux couleurs panachées probablement causées par un potyvirus (*tulip breaking virus*)
 109 (Figure 2), et cette observation sera à l'origine d'une commercialisation à grande échelle de ce type de
 110 tulipes au XVII^{ème} siècle. La virologie végétale, et la virologie en général, ont pris naissance à la fin du

111 XIX^{ème} siècle à l'occasion de travaux décrivant pour la première fois un virus de plante, le virus de la
112 mosaïque du tabac (TMV). Cette découverte issue de l'observation de symptômes sur des plants de tabac
113 est à mettre au crédit de Mayer, Ivanowskij et Beijerinck [12–14].

114 Depuis la découverte du TMV, les scientifiques ont cherché à étudier les interactions entre les plantes
115 et les virus, mais aussi à déchiffrer la manière dont les virus sont transmis d'une plante à une autre.
116 Ainsi, la première moitié du XX^{ème} siècle a vu la mise en place des bases de l'écologie des phytovirus,
117 grâce à l'utilisation de la symptomatologie de l'hôte, de la transmission mécanique expérimentale, des
118 plantes indicatrices, de la biochimie et de la microscopie. Les premières explorations des interactions
119 plantes-virus ont porté sur des plantes cultivées et ont conduit à des découvertes importantes, telles que
120 l'existence d'infections asymptomatiques [15] ou d'infections multiples [16] et également de la
121 protection croisée. Dans les années 1930, les virologues des plantes ont commencé à s'intéresser aux
122 communautés végétales sauvages. De brèves études sur des espèces non cultivées, menées en Allemagne
123 en 1932-33 et en Angleterre en 1948-49, ont permis de mettre en évidence des taux élevés d'infections
124 virales chez les mauvaises herbes des cultures (adventices). Par ailleurs, une étude à plus long terme,
125 mise en œuvre entre 1951 et 1954, a conduit à la détermination de la fréquence et de la distribution des
126 phytovirus dans leur environnement naturel [17]. Au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle, des
127 découvertes ont également été réalisées sur la circulation des virus entre les réservoirs sauvages et le
128 compartiment cultivé [18], ainsi que sur la présence d'infections virales asymptomatiques chez de
129 nombreuses plantes sauvages [19].

130 En parallèle, les virologues ont examiné les interactions entre les virus et leurs vecteurs. La découverte
131 du premier animal vecteur de virus de plante a été rapportée en 1901 et concerne une cicadelle vectrice
132 d'un reovirus du riz (*rice dwarf virus*) [20]. L'importance des insectes dans la transmission des virus a
133 conduit Carter à définir le concept de "trinité écologique" entre les virus, leurs hôtes et leurs vecteurs
134 [21]. Les relations entre les virus transmis par les insectes et leurs vecteurs ont conduit aux notions de
135 persistance ou de non-persistance décrivant la période pendant laquelle le vecteur peut transmettre le
136 virus après son acquisition [21]. D'autres vecteurs de virus ont été identifiés comme des champignons
137 (*Olpidium* spp. pour le *lettuce big vein virus*, [22]) et des nématodes (*Xiphinema* spp. pour le virus du
138 court noué de la vigne, [23]). L'étude des interactions entre les virus eux-mêmes ont révélé les
139 phénomènes de synergies [19,24] et d'antagonismes entre souches ou espèces virales [25,26]. Enfin, les
140 stades intimes des interactions plantes-virus-vecteurs ont été illustrés en 1951 par la démonstration qu'un
141 virus peut influencer la biologie de son vecteur, ce dernier étant préférentiellement attiré par des plantes
142 infectées plutôt que par des plantes saines [27].

143

144 3. L'écologie des virus de plantes et la révolution de la biologie 145 moléculaire 146

147 Dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, la divergence progressive de la virologie et de l'écologie,
148 causée notamment par le développement des méthodes moléculaires à partir des années 1970, a ralenti
149 l'intérêt porté aux travaux en écologie des phytovirus. En effet, l'avènement de la biologie moléculaire
150 a orienté la virologie vers la biologie moléculaire des virus et l'étude de l'infection virale dans des
151 conditions contrôlées, loin des considérations écologiques [28].

152 Toutefois, l'essor des outils de détection sérologique et moléculaire a ouvert un âge d'or pour la
153 découverte des vecteurs des phytovirus. En effet, il a été révélé que les virus végétaux étaient transmis
154 « horizontalement » par un large éventail d'agents, en particulier par les insectes piqueur-suceurs
155 (pucerons, thrips, aleurodes, cochenilles ou cicadelles), mais aussi par les coléoptères, les acariens, les
156 nématodes, les champignons et les protistes [29]. D'autres travaux ont permis de démontrer que les virus
157 de plantes peuvent être transmis « verticalement » par le pollen ou les semences [4,29]. La détection des
158 virus de plantes chez de nombreux végétaux et insectes par des méthodes basées sur des réactions
159 immuno-enzymatiques (immunodiffusion, ELISA, *western blot*, TBIA, etc.), l'amplification PCR et des
160 sondes moléculaires ont mis en évidence que les gammes d'hôtes et de vecteurs de certains phytovirus

161 peuvent être quelquefois remarquablement larges [30–32]. Toutefois, il est actuellement considéré que
 162 les phytovirus sont en grande majorité des généralistes en termes d'hôtes mais des spécialistes en termes
 163 de vecteurs, c'est-à-dire qu'ils ont une large gamme d'hôtes mais une gamme étroite de vecteurs [33].
 164 Des progrès ont également été réalisés dans le décryptage des voies de transmission des virus,
 165 notamment pour la description des modes de transmission circulante et propagative [34,35], ainsi que
 166 les concepts de mélange phénotypique (hétéro-encapsidation) ou de trans-encapsidation [36].
 167 Parallèlement, les interactions plantes-virus commencent à être élucidées au niveau moléculaire, avec
 168 par exemple la démonstration de l'infectivité de l'ARN viral [37], la découverte du rôle du facteur de la
 169 transmission [38], le concept du « *silencing* » de l'ARN viral comme réaction de défense de l'hôte et des
 170 suppresseurs de *RNA silencing* produits par les virus [39–41], ou le rôle de la recombinaison génétique
 171 dans l'évolution des virus [42].

172 D'autres avancées majeures ont été réalisées dans la compréhension de la coévolution plante-virus. La
 173 présence fréquente d'infections virales dans des plantes sauvages asymptomatiques a été confirmée [43–
 174 45]. Ce constat a été étendu avec la suggestion que certains virus pouvaient potentiellement être
 175 bénéfiques pour les plantes [46–49]. Dans l'ensemble, la gamme des interactions plantes-virus s'avère
 176 être diversifiée et couvre un continuum antagonisme-mutualisme en fonction des combinaisons de
 177 génotypes de l'hôte et du virus, ainsi que des conditions environnementales [3,46]. Par ailleurs, des co-
 178 infections de plusieurs virus ont été fréquemment observées dans les plantes cultivées ou sauvages,
 179 accroissant encore la complexité de ces interactions [50,51]. Il a également été constaté que les virus
 180 des plantes étaient capables de manipuler à la fois leurs hôtes et/ou leurs vecteurs afin de maximiser leur
 181 transmission [52–55]. Enfin, des travaux récents ont mis en évidence l'existence d'un compromis
 182 évolutif entre la virulence d'un phytovirus (*maize streak virus*, agent causal de la striure du maïs) et sa
 183 fréquence de transmission [56].

184

185 **4. L'avènement de l'écologie du phytovirome**

186

187 Les divergences observées pendant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle entre les domaines de l'écologie
 188 (principalement axée sur les écosystèmes naturels moins « contrôlables ») et ceux de la virologie
 189 (centrée sur des hôtes modèles ou domestiqués) ont commencé à être comblées au début du XXI^{ème}
 190 siècle. Cette situation a été rendue possible grâce à l'utilisation généralisée des nouvelles techniques de
 191 séquençage à haut débit [28]. De manière globale, ces développements ont stimulé l'émergence des
 192 études du métagénome viral chez les plantes (aussi appelé "phytovirome") et qui correspond au génome
 193 collectif d'une communauté virale au sein d'un individu ou d'un environnement donné [57].

194 L'étude du phytovirome par séquençage à haut débit couplé à des approches sophistiquées de bio-
 195 informatique a initialement été réalisée pour explorer la diversité des virus végétaux. Ces travaux ont
 196 permis de mettre en évidence que la diversité des communautés virales des systèmes naturels est encore
 197 très largement sous-estimée et que la connaissance du phytovirome est biaisée en faveur des plantes
 198 cultivées [58,59]. Les études de viromique sur plantes du compartiment non cultivé, incluant les espèces
 199 sauvages et rudérales, les adventices et les repousses de cultures annuelles restent en effet à ce jour
 200 moins fréquentes que celles réalisées sur plantes cultivées [60]. Elles ont cependant permis de confirmer
 201 que l'infection des plantes par des virus est courante dans la nature [61–64] et que ces infections ne
 202 causent pas toujours des symptômes reconnaissables. De plus, l'existence d'une abondance de virus dits
 203 persistants a été mise en évidence. Ces virus ne se propagent pas entre plantes (transmission horizontale)
 204 mais sont transmis à la descendance par l'intermédiaire de gamètes ou par multiplication végétative de
 205 la plante (transmission verticale) [65]. Des virus végétaux ont aussi été détectés dans de nombreux
 206 environnements biotiques tels que les eaux continentales ou l'atmosphère [57,58,66,67], révélant ainsi
 207 une capacité intrigante de ces phytovirus à circuler entre différents environnements et à y persister avec
 208 des implications écologiques qui restent à élucider.

209

210 Globalement, les virus détectés par les études de viromique peuvent être classés en quatre types
 211 différents : (i) les virus connus déjà décrits dans l'environnement étudié; (ii) les virus connus non décrits
 212 précédemment dans l'environnement étudié; (iii) les nouvelles espèces de virus appartenant à un genre
 213 ou une famille connue, et (iv) les virus totalement nouveaux [60]. Cette diversité de phytovirus
 214 connus/inconnus a d'abord été étudiée à partir d'échantillons groupés, puis approfondie par des analyses
 215 de plantes individuelles (études éco-génomiques [68]), et enfin considérée dans un contexte spatial
 216 explicite (études géo-métagénomiques [58,69]). Ces inventaires de virus végétaux basés sur la
 217 viromique peuvent aider à répondre à d'importantes questions en matière d'écologie virale. A titre
 218 d'exemple, on peut citer l'émergence de nouvelles maladies virales, l'impact du changement climatique
 219 ou des pressions anthropiques sur les populations virales et sur les interactions plantes-virus-vecteurs,
 220 la contribution des virus végétaux au fonctionnement des populations de plantes sauvages, les règles qui
 221 régissent l'assemblage des communautés virales, etc. Ainsi, des travaux de viromique spatiale conduits
 222 dans la région floristique du Cap en Afrique du Sud et en Camargue ont récemment révélé deux résultats
 223 fondamentaux [69] : d'une part, une fréquence des infections virales de plantes significativement plus
 224 élevée en zone cultivée qu'en zone naturelle, suggérant que le regroupement et la concentration
 225 d'organismes génétiquement proches (comme les variétés cultivées) favorisent le développement des
 226 épidémies; d'autre part, l'existence dans le compartiment naturel, encore largement inexploré en termes
 227 de biodiversité des microorganismes, d'une large diversité de phytovirus encore non connus et non
 228 caractérisés. Ces résultats suggèrent qu'une meilleure connaissance du virome des zones bordant les
 229 parcelles agricoles pourrait permettre de mieux comprendre l'émergence de nouvelles maladies et de
 230 mieux contrôler la recrudescence de certaines autres maladies virales.

231 D'autres travaux pionniers réalisés depuis le début du XXI^{ème} siècle ont fait progresser notre
 232 compréhension de plusieurs phénomènes évolutifs et écologiques importants (Figure 3) : (i) les
 233 influences réciproques entre la dynamique des virus et la structure des communautés hôtes multi-espèces
 234 [70], illustrées par des invasions de plantes non indigènes [71,72]; (ii) la propagation des virus végétaux
 235 entre les réservoirs et les populations hôtes (sauvages et domestiques) [73]; (iii) les événements de
 236 débordement (« *spill-over* ») et de retour (« *spill-back* ») [74,75]; (iv) les effets de la simplification des
 237 écosystèmes causée par les activités humaines (et en particulier l'agriculture) sur la biodiversité et
 238 l'émergence de nouveaux virus dans les cultures [69,75–78]; (v) les effets de la diversité des hôtes et de
 239 l'hétérogénéité génétique sur la dynamique des virus [79] et (vi) la compréhension de la diversification
 240 du phytovirome [80–82], contribuant ainsi à une meilleure conceptualisation de l'origine et de
 241 l'évolution de la virosphère [83]. Enfin, l'apport des études de viromique à notre compréhension de la
 242 diversité virale a été reconnu au niveau international, et notamment par le Comité International de
 243 Taxonomie des Virus (ICTV) qui a récemment recommandé l'incorporation de certains virus identifiés
 244 uniquement à partir de données métagénomiques dans son système de classification officiel [84].

245

246 5. Opportunités d'étude de l'écologie du phytovirome

247

248 Les technologies de séquençage à haut débit (HTS) permettent de détecter potentiellement, et sans a
 249 priori, l'ensemble des virus présents dans un échantillon. Elles offrent donc une opportunité majeure
 250 pour améliorer la caractérisation des viromes et pour étudier la richesse virale à de multiples échelles,
 251 de la plante individuelle aux écosystèmes entiers. En outre, ces technologies permettent de fournir de
 252 nouvelles informations sur le déchiffrement de la diversité virale intra-spécifique, facilitant la
 253 caractérisation des variants et permettant ainsi de mieux démêler la génomique des populations virales.
 254 À l'avenir, la viromique pourrait également être utilisée pour quantifier les proportions relatives des
 255 espèces et des variants de virus au sein d'un échantillon ou d'un environnement, ce qui permettrait de
 256 nouvelles analyses de la prévalence des virus et de la dynamique des co-infections.

257 Les technologies HTS ont par ailleurs permis d'accélérer considérablement la découverte de nouveaux
 258 virus et de nouveaux hôtes pour des virus déjà connus. Dans de nombreux cas, la viromique offre un
 259 avantage considérable pour la caractérisation des viromes par rapport à des protocoles de détection
 260 spécifiques faisant appel à des techniques immuno-enzymatiques ou moléculaires [85,86]. En effet,

261 l'utilisation de ces techniques plus classiques est très limitée lorsqu'il s'agit de prendre en compte de
262 nouveaux virus ou de nouveaux variants sérologiques ou moléculaires d'une espèce virale. Si l'objectif
263 est de caractériser indépendamment le virome de plusieurs espèces végétales au sein d'une communauté,
264 le nombre de virus potentiellement ciblés devient encore plus important, ce qui rend les approches de
265 détection ciblées très complexes, voire inenvisageables. Cette réalité associée au coût de ces approches
266 explique en partie pourquoi les études écologiques sur les virus ont jusqu'à présent largement été
267 focalisées sur un petit nombre d'espèces de virus. Grâce à son approche non ciblée et globale, la
268 viromique a le potentiel de générer des études plus complètes du virome végétal à l'échelle des
269 communautés et des paysages [87].

270 La troisième génération des technologies HTS, et notamment l'approche de séquençage par nanopore,
271 a laissé entrevoir récemment de nouvelles perspectives prometteuses à plusieurs niveaux [88–94]. Cette
272 approche, par sa miniaturisation et sa portabilité, permet de se rapprocher du terrain et de détecter
273 quasiment en temps réel les virus connus ou inconnus potentiellement associés aux épidémies virales.
274 Une étude pionnière a ainsi démontré la faisabilité de la détection en quelques heures et au terrain de
275 bégomovirus infectant le manioc (*East African cassava mosaic virus* et *African cassava mosaic virus*)
276 à partir d'échantillons de feuille, de tige, de tubercule et d'insectes-vecteurs [90]. Cette approche produit
277 en outre des lectures longues qui ont permis, dans la majorité des études récentes, l'obtention de
278 séquences génomiques complètes. Il semble toutefois encore préférable de compléter le séquençage par
279 nanopore, quand les budgets le permettent, par un séquençage Illumina afin de gommer les erreurs de
280 séquençage encore nombreuses de cette technique HTS de troisième génération [89].

281

282 **6. Les défis de l'écologie du phytovirome**

283

284 Les technologies HTS peuvent théoriquement fournir une analyse holistique des espèces virales
285 présentes au sein d'un échantillon : détection, séquençage du génome et identification de variants voire
286 même leur quantification relative. Néanmoins, la réalisation d'une telle analyse se heurte actuellement
287 à de nombreux verrous techniques, méthodologiques, scientifiques et budgétaires (Figure 4).

288 Jusqu'à présent, les technologies HTS ont été principalement utilisées sur des plantes individuelles,
289 généralement symptomatiques, pour identifier la ou les espèces virales présentes. Un écueil actuel est
290 d'opérer une transition depuis le séquençage de plantes individuelles vers le séquençage de populations
291 de centaines voire de milliers de plantes permettant d'analyser le virome de communautés végétales.
292 Alors que les tests classiquement utilisés comme la (RT-) PCR et l'ELISA sont bons marchés et peuvent
293 être appliqués sur un grand nombre d'échantillons, le coût plus élevé des technologies HTS limite leur
294 utilisation massive. Les chercheurs doivent actuellement trouver un équilibre entre le nombre de plantes
295 analysées, le nombre de séquences générées par échantillon et la possibilité d'analyser des échantillons
296 composites, ce qui a aussi un impact sur l'interprétation des résultats. Cette transition d'échelle nécessite
297 donc de résoudre une série de problèmes, depuis l'échantillonnage des plantes au sein de l'écosystème
298 au choix du type d'extraction nucléique virale, en passant par le séquençage en lui-même et les analyses
299 bio-informatiques qui en découlent.

300

301 **6.1. La définition d'un échantillonnage approprié**

302 Différentes stratégies d'échantillonnage peuvent être considérées selon que l'on envisage d'étudier une
303 seule espèce virale ou, au contraire, un virome complet. L'échantillonnage peut être réalisé à une seule
304 reprise ou de manière répétée au cours de la même saison, ou au cours de saisons ou d'années différentes.
305 Le moment de prélèvement est un élément crucial à considérer, en particulier dans le cas d'un
306 échantillonnage unique.

307 Cela peut correspondre au moment où la charge virale est la plus élevée. Le taux de multiplication des
308 virus et leur accumulation au sein des plantes hôtes peuvent être influencés par divers facteurs : le temps

309 post-infection; les conditions environnementales [95,96]; le stade phénologique de la plante [97];
310 l'organe échantillonné [98–100], ainsi que le génotype de la plante et du virus [101]. Il n'y a
311 généralement pas de timing universellement optimal, mais les titres viraux sont généralement plus élevés
312 dans les tissus en croissance active. Une connaissance de la biologie des virus déjà connus au sein de la
313 communauté végétale est donc un élément important, permettant de guider le choix des périodes
314 d'échantillonnage.

315 La date de prélèvement peut aussi correspondre au moment où la diversité de virus détectables est la
316 plus grande, ou à la fin de la saison de végétation active de manière à maximiser les possibilités de
317 transmission horizontale. Le stade actuel des connaissances en écologie des phytovirus fait du choix
318 raisonné d'un timing d'échantillonnage une tâche très compliquée, voire impossible pour des virus peu
319 caractérisés voire inconnus. Dans ce cas, un échantillonnage répété peut être privilégié afin d'identifier
320 le timing le plus approprié.

321

322 6.2. L'échantillonnage dans l'écosystème

323 Le protocole utilisé pour la collecte des échantillons sur le terrain est essentiel mais souvent mal
324 documenté dans les publications. Pour soutenir une analyse et une interprétation solides des données, il
325 est essentiel de relier la question à étudier, la conception globale de l'étude et la stratégie
326 d'échantillonnage, incluant notamment la méthode de conservation et de conditionnement des
327 échantillons qui s'avère être cruciale en fonction des acides nucléiques ciblés (ARN double brin, ARN
328 interférents, ADN – voir section 6.4). Plusieurs questions essentielles doivent ainsi être considérées :
329 quelle configuration spatiale et quelle surface unitaire d'échantillonnage seront les plus appropriées ?
330 Quelles espèces hôtes seront choisies ? Quand et à quelle fréquence l'échantillonnage doit-il avoir lieu
331 ? Combien d'individus seront sélectionnés ? Quel sera le processus spécifique de sélection des plantes :
332 le stade de développement, la taille ou l'état des symptômes doivent-ils être pris en compte ? Les
333 réponses à ces questions influenceront la nature des analyses statistiques qui peuvent être menées et
334 leurs conclusions.

335 La stratégie d'échantillonnage doit être précisément définie avant le travail de terrain afin d'éliminer la
336 subjectivité de l'échantillonneur et les biais associés, par exemple par une propension à prélever des
337 plantes symptomatiques [102]. Ainsi, des points prédéterminés peuvent être présélectionnés avec un
338 système d'information géographique (SIG), puis localisés avec un système de positionnement global
339 (GPS) sur le terrain. Ces points peuvent être situés de manière complètement aléatoire ou être
340 sélectionnés sur une grille pour un échantillonnage systématique [69]. Alternativement,
341 l'échantillonnage peut être effectué à des intervalles prédéterminés le long de transects, une approche
342 qui nécessite moins de technologie de mise en œuvre [102]. Le protocole d'échantillonnage doit
343 également spécifier les modalités de prélèvement à chaque point de prélèvement ou unité
344 d'échantillonnage. Cette unité d'échantillonnage peut correspondre à une ou plusieurs plantes voire à
345 un quadrat dans lequel des plantes seront prélevées selon les modalités envisagées [103].

346 La stratégie décrite ci-dessus peut ensuite être adaptée selon l'objectif de l'étude. Quand il s'agit de
347 quantifier la prévalence de l'infection - la proportion de plantes individuelles qui ont une infection virale
348 détectable -, les plantes seront analysées individuellement et échantillonnées en utilisant des méthodes
349 standard d'écologie végétale ciblées, tandis que l'infection virale peut être considérée comme une
350 caractéristique de la plante. Les plantes individuelles peuvent être codées séparément et séquencées. Il
351 est également possible d'analyser des pools composites, puis grâce à des méthodes spécifiques (RT-
352 PCR ou ELISA de rechercher les virus d'intérêt dans les plantes individuées. Dans certains cas, il est
353 essentiel de s'assurer que les individus sont échantillonnés sans tenir compte des symptômes et que
354 toutes les classes d'âge / taille sont évaluées.

355 Un objectif plus complexe est de caractériser la composition d'espèces (ou de variants) d'une
356 communauté ou d'une population virale. En règle générale, l'objectif est alors d'identifier la totalité ou
357 la plupart des taxons viraux au sein de l'unité d'étude et de comparer la composition de la communauté
358 virale à travers les espèces hôtes, les localisations ou les communautés végétales. L'effort

359 d'échantillonnage peut être structuré pour refléter la représentation relative des espèces composant la
360 communauté végétale, sur la base par exemple de leur abondance, de leur couverture ou de leur biomasse
361 relative. [57,104]. Un problème connexe est la profondeur d'échantillonnage : combien d'échantillons
362 doivent être prélevés ? En règle générale, plus l'échantillonnage est important, plus la probabilité
363 d'identifier des virus peu prévalents dans la communauté étudiée augmente. Les courbes d'accumulation
364 de taxons en fonction de la profondeur d'échantillonnage illustrent l'augmentation du nombre d'espèces
365 détectées avec un effort d'échantillonnage croissant, mais ne prédisent pas l'identité des espèces.
366 Cependant, elles sont parfois utilisées à petite échelle lors de tests préliminaires pour évaluer
367 l'échantillonnage à partir duquel le nombre d'espèces virales atteint un plateau [105].

368 L'impartialité de l'échantillonnage est essentielle si l'objectif est d'évaluer les profils de diversité virale,
369 y compris la richesse des taxons viraux (exprimés à différents niveaux – variants, espèces, genres ou
370 familles). Par ailleurs, l'échantillonnage peut être basé sur « l'individu » ou sur « l'échantillon ». Les
371 évaluations individuelles examinent des individus choisis aléatoirement sur le terrain, tandis que les
372 évaluations basées sur un échantillon évaluent le nombre de taxons cibles dans des unités
373 d'échantillonnage collectives telles que les quadrats [105]. Le choix entre ces modalités peut de façon
374 évidente impacter les valeurs de richesse et de diversité virales, ou la capacité à reconstituer ou non des
375 molécules génomiques complètes [106].

376

377 6.3. Analyser des plantes individuées ou regroupées ?

378 Un autre paramètre crucial est la stratégie de regroupement (ou « *pooling* ») des individus ou des
379 échantillons pour le séquençage (dans la préparation de banques par exemple), ce qui peut être nécessaire
380 pour réduire les coûts. La taille optimale du pool dépend d'un équilibre parfois difficile à atteindre entre
381 le nombre de pools à séquencer et le nombre de plantes individuelles par pools. L'augmentation de la
382 taille du pool est susceptible d'exacerber la concurrence entre les séquences virales ; plus le pool est
383 grand, plus grand est le risque que certains virus à faible prévalence ou à faible concentration deviennent
384 indétectables si d'autres virus sont présents en forte abondance/concentration (effet de dilution).

385 Le *pooling* d'échantillons imbriqués est une approche intéressante pour déterminer une stratégie
386 optimale de *pooling*. Dans cette approche, une série de pools avec un nombre croissant de plantes
387 groupées provenant de la même communauté ou d'un nombre croissant de communautés est collectée et
388 séquencée. Les résultats donneront un aperçu de l'hétérogénéité spatiale de la population échantillonnée
389 et donc de la taille de l'échantillon nécessaire à une bonne représentation. Dans tous les cas, il est
390 conseillé de collecter et de stocker des plantes individuelles pour la confirmation en aval des résultats
391 HTS.

392 Les stratégies de *pooling* doivent également tenir compte du fait que certaines espèces végétales peuvent
393 contenir des inhibiteurs (métabolites secondaires par exemple) qui peuvent affecter négativement les
394 étapes d'extraction, d'amplification et de séquençage dans certains protocoles. Une étude préliminaire
395 de l'effet inhibiteur potentiel des diverses espèces échantillonnées peut être éventuellement réalisée au
396 moyen de (RT-) PCR ciblée sur des mélanges de plantes [98].

397

398 6.4. Impact du choix de l'acide nucléique viral à extraire et du séquençage

399 La sélection de la population d'acides nucléiques cibles est cruciale car elle définit les types de séquences
400 virales qui seront détectées. Il faut ainsi choisir entre le séquençage d'ARN / ADN total, des acides
401 nucléiques associés aux virions (VANA), des ARN double brin, des ARN interférents, des ADN simple
402 brin circulaires ou des produits d'amplification (RT-) PCR ciblés à l'aide d'amorces génériques. La
403 fouille bioinformatique de ressources accessibles publiquement, comme les jeux de données
404 transcriptomiques de la Sequence Reads Archive de GenBank, peut permettre de réaliser des études du
405 virome voire des études conjointes ou corrélatives du virome et du transcriptome de l'hôte [107,108].

406 Alors que les technologies HTS ont la capacité théorique de cibler n'importe quel acide nucléique viral
 407 dans n'importe quelle plante hôte ou vecteur, les protocoles d'extraction disponibles présentent chacun
 408 des avantages et des limitations spécifiques [58,106,109]. Ces limitations justifient une évaluation
 409 soigneuse *a priori* des virus et des viroïdes susceptibles d'infecter les plantes de la zone d'étude ainsi
 410 que des questions posées par l'étude envisagée. Par exemple, il n'existe actuellement aucun viroïde
 411 connu infectant les Poacées et la méthode VANA - concentrant l'ADN et l'ARN associés aux virions et
 412 excluant théoriquement les viroïdes - pourrait être un bon choix lors de l'étude d'échantillons de prairies,
 413 étant entendu que l'analyse n'identifierait probablement pas un nouveau viroïde infectant les Poacées
 414 étudiées.

415 Un autre élément important à considérer à cette étape est le risque de contamination, qu'elle soit
 416 d'origine humaine - lors du prélèvement ou du traitement des échantillons ou technologique (e.g.
 417 phénomène d'index-hopping par la technique Illumina) [110] qui pourrait entraîner une identification
 418 erronée des combinaisons virus-hôte. Les mêmes précautions et normes actuellement utilisées dans les
 419 tests (RT-) PCR doivent être mises en œuvre pour les technologies HTS [86,111] avec par exemple
 420 l'utilisation d'une série de contrôles (positifs / négatifs, internes / externes, *spiking*) à chaque étape du
 421 protocole HTS utilisé. En outre, la confirmation par d'autres méthodes de la présence du virus identifié
 422 dans des échantillons individuels est fortement recommandée.

423 Concernant le séquençage en lui-même, la longueur des *reads* (*read length*) et la profondeur de
 424 séquençage (*sequencing depth*) sont deux éléments clés à considérer. La longueur des *reads* peut affecter
 425 la précision du séquençage [89] mais aussi influencer l'assemblage des séquences et leur annotation,
 426 avec un impact sur la capacité à reconstruire des génomes viraux et à identifier des variants viraux
 427 [112,113]. Les protocoles permettant un enrichissement des séquences virales, tels que VANA ou ARN
 428 double brin ou bien ARN « ribodéplétés », peuvent améliorer significativement la sensibilité de
 429 détection des virus pour une profondeur de séquençage donnée. Ces protocoles sont donc appréciés pour
 430 les études d'écologie virale [69,73,114–117]. La profondeur de séquençage peut quant à elle agir sur la
 431 probabilité de détection de faux positifs [86]. La distinction appropriée entre la présence d'un virus en
 432 très faible proportion dans un échantillon et la contamination de cet échantillon par quelques séquences
 433 de virus d'un autre échantillon lors de l'application du HTS représente ainsi un défi important qui doit
 434 être relevé dans le futur en fixant la limite de détection. Plusieurs paramètres pourraient être utilisés tels
 435 que le nombre absolu de séquences ou la proportion relative de séquences.

436

437 6.5. Analyses bio-informatiques

438 Les progrès de la bio-informatique permettent d'exploiter la puissance des technologies de séquençage
 439 à haut débit aidant ainsi à mieux identifier et caractériser les génomes viraux. Si la profondeur du
 440 séquençage ou la disponibilité des cibles virales sont suffisantes, les contigs assemblés (= séquences
 441 consensus issues de l'assemblage de lectures - ou *reads* - de séquences chevauchantes) à partir de
 442 lectures courtes (produites par exemple par séquençage IlluminaTM), de lectures longues natives (issues
 443 par exemple de la technologie de séquençage par nanopore) ou de mélanges de lectures courtes et
 444 longues peuvent conduire à l'obtention de la séquence (quasi) complète de génomes viraux.

445 Ces analyses bio-informatiques peuvent ensuite conduire à examiner les séquences virales assemblées
 446 et à les attribuer à des unités taxonomiques virales, afin d'estimer la structure génétique et la diversité
 447 des phytovirus (richesse et uniformité), ou même de caractériser de nouvelles espèces virales.
 448 Cependant, différents termes souvent utilisés dans ces analyses, tels que les notions d'espèces virales,
 449 isolats, souches, unité taxonomique opérationnelle (OTU) ou quasi-espèces, ont des définitions encore
 450 discutées parmi les virologues [118–120].

451 Le point crucial est donc de définir clairement l'unité fondamentale utilisée pour l'estimation de la
 452 diversité virale [63], qui peut être la famille virale [69] ou les OTUs utilisés comme proxys de l'espèce
 453 virale [109,121]. D'autres problèmes peuvent rendre complexes ces analyses de diversité ou de richesse
 454 virales, comme par exemple des assemblages de génome viraux incomplets pouvant entraîner la
 455 représentation de différents virus par des régions génomiques non-chevauchantes (c'est le cas si l'espèce

456 virale 1 est représentée par sa protéine de capsidie tandis que l'espèce virale 2 est représentée par son
 457 gène de la polymérase); ou des assemblages chimériques dus à des régions homologues entre plusieurs
 458 souches ou espèces virales. L'expertise du chercheur est donc requise pour déterminer précisément la
 459 diversité du virome au sein d'une population ou d'une communauté végétale.

460 Cette expertise est tout aussi essentielle dans l'identification de nouvelles espèces virales [113] en raison
 461 des limites des approches d'annotation basées sur les homologies de séquences (BLASTn ou BLASTx).
 462 Les banques de données mal annotées ou incomplètes [121] peuvent conduire à une identification
 463 erronée des virus et *in fine* à une sous-estimation des communautés virales présentes. Néanmoins,
 464 l'attribution (assignation) des *reads* peut être affinée à l'aide d'un algorithme de placement
 465 phylogénétique, comme récemment illustré pour l'analyse de la phylogénie des *Mastrevirus* [64]. Un
 466 autre défi majeur est la caractérisation biologique (gamme d'hôtes, mode de transmission,
 467 symptomatologie, répartition géographique, etc.) de tout virus nouvellement identifié et, pour y
 468 répondre, une démarche logique a été récemment décrite [112].

469 Enfin, les technologies HTS permettent d'analyser la diversité génétique des populations virales *via* par
 470 exemple l'examen des polymorphismes mononucléotidiques (SNPs). Cet aspect est d'un grand intérêt
 471 en écologie virale afin de mieux mesurer et cartographier les empreintes évolutives de l'émergence de
 472 virus à l'échelle de la communauté végétale. Par exemple, la caractérisation détaillée d'isolats viraux
 473 permettrait de comparer une population virale dans un hôte primaire et dans un ou plusieurs autres hôtes,
 474 validant ou invalidant ainsi le rôle de réservoirs potentiels. Cependant, le génotypage et l'haplotypage
 475 des SNPs sont déjà un défi à l'échelle d'un virus unique dans une seule plante, et ils sont encore plus
 476 complexes pour une diversité de virus et d'hôtes au sein d'une communauté végétale (mélanges d'isolats
 477 viraux différents, différenciation entre SNP et erreurs de séquençage, confirmation des SNP par PCR
 478 ciblée en temps réel, etc.). L'analyse des duplicata est une stratégie souvent utilisée lors d'analyses de
 479 diversité par métabarcoding – technique de HTS de caractérisation de la composition taxonomique d'un
 480 échantillon par l'amplification et le séquençage d'une séquence universelle [122] et pourrait permettre
 481 de distinguer les SNPs réels des erreurs de séquençage mais reste une approche coûteuse.

482

483 7. Conclusion

484

485 L'étude de l'écologie des phytovirus, depuis la fin du XIX^{ème} siècle, a été accélérée par l'évolution des
 486 techniques de détection et de caractérisation des virus. La dernière révolution technique, l'utilisation des
 487 technologies HTS pour détecter les virus végétaux dans divers environnements et dans de nombreuses
 488 plantes simultanément, permet pour la première fois d'étudier en profondeur le métagénome viral ou
 489 virome. La capacité de ces technologies à détecter sans *a priori* tous ou presque tous les virus dans un
 490 échantillon ouvre d'énormes opportunités pour améliorer la caractérisation des viromes et répondre à de
 491 nouvelles questions, tant en virologie végétale qu'en virologie animale [123]. On peut ainsi s'attendre à
 492 des avancées en termes d'étiologie des maladies avec le dépassement du concept de "trinité écologique"
 493 virus-hôtes-vecteurs et la prise en compte du pathobiome [124] ou encore l'amélioration de nos
 494 connaissances sur la propagation des virus entre les réservoirs et les hôtes (sauvages, domestiques,
 495 humains) ou sur le rôle écologique joué par les vecteurs dans le choix des hôtes. Ces travaux devraient
 496 en outre se traduire par une meilleure appréciation de la contribution écologique des virus à l'échelle de
 497 l'écosystème et tendre vers une meilleure définition des facteurs impliqués dans l'émergence des
 498 nouvelles maladies virales.

499 Néanmoins, l'utilisation des approches HTS dans les études écologiques est associée à une série de défis
 500 décrits en détails dans cette revue et auxquels une attention particulière doit être portée à chaque étape :
 501 sur le terrain, au laboratoire et pour les analyses bio-informatiques. Sur ce dernier point, il reste beaucoup
 502 d'efforts à faire pour optimiser le stockage, le partage et l'utilisation des données et des métadonnées
 503 issues des études de métagénomique virale, ouvrant ainsi la voie à la réutilisation de ces jeux de données
 504 par d'autres scientifiques pour des travaux de datamining, et plus largement pour la mise en place d'une
 505 veille sanitaire numérique des maladies. Les avancées récentes de l'écologie des phytovirus, qui sont

506 potentiellement transférables à l'écologie des virus animaux et humains, s'inscrivent dans une histoire
507 riche de presque un siècle et demi d'échanges conceptuels et techniques entre la virologie végétale et la
508 virologie vétérinaire et humaine.

509

510 8. References

- 511 1. Montgomery RA, Macdonald DW. COVID-19, Health, Conservation, and Shared Wellbeing:
512 Details Matter. *Trends Ecol Evol* 2020 ; 35 : 748–750.
- 513 2. Cooper I, Jones RAC. Wild Plants and Viruses: Under-Investigated Ecosystems. *Adv Virus Res*
514 2006 ; 67 : 1–47.
- 515 3. Fraile A, García-Arenal F. Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. *Curr*
516 *Opin Virol.* 2016 ; 17 : 50–56.
- 517 4. Lefeuvre P, Martin DP, Elena SF, Shepherd DN, Roumagnac P, Varsani A. Evolution and
518 ecology of plant viruses. *Nat Rev Microbiol* 2019 ; 17 : 632–644.
- 519 5. Jones RAC. Plant virus ecology and epidemiology: Historical perspectives, recent progress and
520 future prospects. *Ann Appl Biol* 2014 ; 164 : 320–347.
- 521 6. Gibbs AJ. Virus Ecology — “Struggle” of the Genes. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB,
522 Ziegler H. *Physiological Plant Ecology III*. Berlin : Springer Berlin Heidelberg, 1983. pp. 537–
523 558.
- 524 7. Hull R. *Plant Virology : Fifth Edition*. San Diego : Elsevier Academic Press, 2014.
- 525 8. Matthews REF, Hull R. *Matthews' Plant Virology*. San Diego : Elsevier Academic Press, 2002.
- 526 9. Van Der Want JPH, Dijkstra J. A history of plant virology. *Arch Virol.* 2006 ; 151 : 1467–1498.
- 527 10. Inouye T, Osaki T. The first record in the literature of the possible plant virus disease that
528 appeared in “Manyoshu”, a Japanese classic anthology, as far back as the time of the 8th century.
529 *Japanese J Phytopathol* 1980 ; 46 : 49–50.
- 530 11. Saunders K, Bedford ID, Yahara T, Stanley J. The earliest recorded plant virus disease. *Nature*
531 2003 ; 422 : 831.
- 532 12. Mayer A. Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtsch Versuchs-stationen* 1886 ; 32
533 : 451–467.
- 534 13. Ivanovskij D. Ueber die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Cent Bakteriolog Parasitenkd und*
535 *Infekt II Abt* 1899 ; 5 : 250–254.
- 536 14. Beijerinck M. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der
537 Tabaksblätter. *Cent Bakteriolog Parasitenkd und Infekt II Abt* 1899 ; 5 : 27–33.
- 538 15. Nishimura M. A Carrier of the Mosaic Disease. *Bull Torrey Bot Club* 1918 ; 45 : 219–233.
- 539 16. Dickson BT. Tobacco and tomato mosaic. *Science* 1925 ; 62 : 398.
- 540 17. MacClement WD, Richards MG. Virus in wild plants. *Can J Bot* 1956 ; 34 : 793–799.
- 541 18. Storey H, McClean APD. The transmission of streak disease between maize, sugar cane and wild

- 542 grasses. *Ann Appl Biol* 1930 ; XVII : 691–719.
- 543 19. Bennett CW. Latent virus of dodder and its effect on sugar beet and other plants. *Phytopathology*
544 1944 ; 34 : 77–91.
- 545 20. Takami N. On dwarf disease of rice plant and “tsumaguro-yokabai”. *J Jpn Agric Soc* 1901 ; 241
546 : 22–30.
- 547 21. Carter W. Populations of Thrips tabaci, with special reference to virus transmission. *J Anim Ecol*
548 1939 ; 8: 261-276.
- 549 22. Campbell RN. Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, oltidium brassicae.
550 *Nature* 1962 ; 195 : 675–677.
- 551 23. Hewitt WB, Raski DJ, Goheen AC. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines.
552 *Phytopathology* 1958 ; 48: 586–595.
- 553 24. Vanterpool TC. Streak or winter blight of tomato in Quebec. *Phytopathology*. 1926 ; 16 : 311.
- 554 25. Bawden FC, Kassanis B. Some properties of tobacco etch virus. *Ann Appl Biol* 1941 ; 28: 107–
555 118.
- 556 26. Bawden FC, Kassanis B. The suppression of one plant virus by another. *Ann Appl Biol*. 1945 ;
557 32 : 52–57.
- 558 27. Kennedy JS. Benefits to aphids from feeding on galled and virus-infected leaves. *Nature*. 1951 ;
559 168 : 825–6.
- 560 28. Malmstrom CM, Melcher U, Bosque-Pérez NA. The expanding field of plant virus ecology:
561 Historical foundations, knowledge gaps, and research directions. *Virus Res* 2011 ; 159 : 84–94.
- 562 29. Harrison BD. Plant virus ecology: ingredients, interactions and environmental influences. *Ann*
563 *Appl Biol* 1981 ; 99 : 195–209.
- 564 30. Timian RG. The range of symbiosis of barley and barley strip mosaic virus. *Phytopathology* 1974
565 ; 64 : 342–345.
- 566 31. Sherwood JL, German TL, Moyer JW, Ullman D. Tomato spotted wilt. *Plant Heal Instr* 2003.
- 567 32. Zitter TA, Murphy JF. Cucumber mosaic virus. *Plant Heal Instr* 2009.
- 568 33. Power AG, Flecker AS. Virus specificity in disease systems: are species redundant? In: Kaveira
569 P, Levin SA, editors. *The importance of species*. USA: Princeton University Press; 2003. pp.
570 330–347.
- 571 34. Gildow FE. Transcellular Transport of Barley Yellow Dwarf Virus Into the Hemocoel of the
572 Aphid Vector, *Rhopalosiphum padi*. *Phytopathology* 1985 ; 75: 292–297.
- 573 35. Ullman DE, German TL, Sherwood JL, Westcot DM, Cantone FA. Tospovirus replication in
574 insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the
575 S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* 1993 ;
576 83 : 456–463.
- 577 36. Rochow WF. Barley Yellow Dwarf Virus: Phenotypic Mixing and Vector Specificity. *Science*
578 1970 ; 167 : 875–878.

- 579 37. Fraenkel-Conrat H, Williams RC. Reconstitution of active Tobacco mosaic virus from its
580 inactive protein and nucleic acid components. *Proc Natl Acad Sci* 1955 ; 41: 690–698.
- 581 38. Thornbury DW, Hellmann GM, Rhoads RE, Pirone TP. Purification and characterization of
582 potyvirus helper component. *Virology* 1985 ; 144 : 260–267.
- 583 39. Lindbo JA, Silva-rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG. Induction of a Highly Specific
584 Antiviral State in Transgenic Plants : Implications for Regulation of Gene Expression and Virus
585 Resistance. *Plant Cell* 1993 ; 5 : 1749–1759.
- 586 40. Wang D, Maule AJ. Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication.
587 *Science* 1995 ; 267 : 229–31.
- 588 41. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing : A general strategy used
589 by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci* 1999 ; 112 : 14147–14152.
590 doi:10.1073/pnas.1513950112
- 591 42. Bujarski JJ, Kaesberg P. Genetic recombination between RNA components of a multipartite
592 plant virus. *Nature* 1986 ; 321 : 528–531.
- 593 43. Kelley SE. Viral pathogens and the advantage of sex in the perennial grass *Anthoxanthum*
594 *odoratum*. *Philos Trans R Soc B* 1994 ; 346 : 295–302.
- 595 44. Creamer R, Luque-Williams M, Howo M. Epidemiology and incidence of beet curly top
596 geminivirus in naturally infected weed hosts. *Plant Dis* 1996 ; 80 : 533–535.
- 597 45. Anaya-López JL, Torres-Pacheco I, González-Chavira M, Garzon-Tiznado JA, Pons-Hernandez
598 JL, Guevara-González RG, et al. Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild
599 peppers. *HortScience* 2003 ; 38 : 251–255.
- 600 46. Gibbs A. A Plant Virus that Partially Protects Its Wild Legume Host against Herbivores.
601 *Intervirology* 1980 ; 13 : 42–47.
- 602 47. Xu P, Chen F, Mannas JP, Feldman T, Sumner LW, Roossinck MJ. Virus infection improves
603 drought tolerance. *New Phytol* 2008 ; 180 : 911–21. 3
- 604 48. Roossinck MJ. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat Rev Microbiol* 2011 ; 9 : 99–
605 108.
- 606 49. Roossinck MJ. Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* 2015 ;
607 479–480 : 271–7.
- 608 50. Hammond J. Viruses occurring in *Plantago* species in England. *Plant Pathol* 1981 ; 30 : 237–
609 243.
- 610 51. Jooste AEC, Molenaar N, Maree HJ, Bester R, Morey L, de Koker WC, et al. Identification and
611 distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *Eur J Plant*
612 *Pathol* 2015 ; 142 : 363–375.
- 613 52. Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA. Plant viruses alter insect behavior to enhance
614 their spread. *Sci Rep* 2012 ; 2 : 578.
- 615 53. Moreno-Delafuente A, Garzo E, Moreno A, Fereres A. A plant virus manipulates the behavior
616 of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS One* 2013 ; 8:
617 e61543.

- 618 54. Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC. Deceptive chemical signals induced by a plant virus
619 attract insect vectors to inferior hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107: 3600–5.
- 620 55. Mauck KE. Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what
621 can it teach us about virus evolution? *Curr Opin Virol* 2016 ; 21 : 114–123.
- 622 56. Monjane AL, Dellicour S, Hartnady P, Oyeniran KA, Owor BE, Bezeidenhout M, et al. Symptom
623 evolution following the emergence of maize streak virus. *Elife* 2020 ; 9.
- 624 57. Roossinck MJ. Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. *Annu Rev Genet* 2012 ; 46
625 : 359–69.
- 626 58. Roossinck MJ, Martin DP, Roumagnac P. Plant virus metagenomics: Advances in virus
627 discovery. *Phytopathology*. 2015 ; 105 : 716-727.
- 628 59. Wren JD, Roossinck MJ, Nelson RS, Scheets K, Palmer MW, Melcher U. Plant virus biodiversity
629 and ecology. *PLoS Biol* . 2006 ; 4 : 0314–0315.
- 630 60. Stobbe AH, Roossinck MJ. Plant virus metagenomics: What we know and why we need to know
631 more. *Front Plant Sci*. 2014 ; 5 : 1–4.
- 632 61. Muthukumar V, Melcher U, Pierce M, Wiley GB, Roe BA, Palmer MW, et al. Non-cultivated
633 plants of the Tallgrass Prairie Preserve of northeastern Oklahoma frequently contain virus-like
634 sequences in particulate fractions. *Virus Res* 2009 ; 141 : 169–173.
- 635 62. Susi H, Filloux D, Frilander MJ, Roumagnac P, Laine AL. Diverse and variable virus
636 communities in wild plant populations revealed by metagenomic tools. *PeerJ* 2019 ; 7 : e6140
- 637 63. Claverie S, Bernardo P, Kraberger S, Hartnady P, Lefeuvre P, Lett JM, et al. From Spatial
638 Metagenomics to Molecular Characterization of Plant Viruses: A Geminivirus Case Study. *Adv
639 Virus Res* 2018 ; 101 : 55-83.
- 640 64. Claverie S, Ouattara A, Hoareau M, Filloux D, Varsani A, Roumagnac P, et al. Exploring the
641 diversity of Poaceae-infecting mastreviruses on Reunion Island using a viral metagenomics-
642 based approach. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 1–11.
- 643 65. Roossinck MJ. Lifestyles of plant viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010 ; 365 : 1899–
644 905.
- 645 66. Culley AI, Lang AS, Suttle CA. Metagenomic Analysis of Coastal RNA Virus Communities.
646 *Science* 2006 ; 312: 1795–1798.
- 647 67. Whon TW, Kim M-S, Roh SW, Shin N-R, Lee H-W, Bae J-W. Metagenomic Characterization
648 of Airborne Viral DNA Diversity in the Near-Surface Atmosphere. *J Virol* 2012 ; 86 : 8221–
649 8231.
- 650 68. Roossinck MJ, Saha P, Wiley GB, Quan J, White JD, Lai H, et al. Ecogenomics: using massively
651 parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Mol Ecol* 2010 ; 19 Suppl 1 : 81–8.
- 652 69. Bernardo P, Charles-Dominique T, Barakat M, Ortet P, Fernandez E, Filloux D, et al.
653 Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of
654 plant viruses at the ecosystem scale. *ISME J* 2018 ; 12 : 173–184.
- 655 70. Power AG, Mitchell CE. Pathogen spillover in disease epidemics. *Am Nat* 2004 ; 164: S79–S89.
- 656 71. Borer ET, Hosseini PR, Seabloom EW, Dobson AP. Pathogen-induced reversal of native

- 657 dominance in a grassland community. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 5473–5478.
- 658 72. Malmstrom CM, McCullough AJ, Johnson HA, Newton LA, Borer ET. Invasive annual grasses
659 indirectly increase virus incidence in California native perennial bunchgrasses. *Oecologia* 2005
660 ; 145: 153–64.
- 661 73. Ma Y, Marais A, Lefebvre M, Faure C, Candresse T. Metagenomic analysis of virome cross-talk
662 between cultivated *Solanum lycopersicum* and wild *Solanum nigrum*. *Virology* 2020 ; 540 : 38–
663 44.
- 664 74. Elena SF, Fraile A, García-Arenal F. Evolution and emergence of plant viruses. *Adv Virus Res*
665 2014 ; 88 : 161–191.
- 666 75. Roossinck MJ, García-Arenal F. Ecosystem simplification, biodiversity loss and plant virus
667 emergence. *Curr Opin Virol* 2015 ; 10 : 56–62.
- 668 76. Pagán I, González-Jara P, Moreno-Letelier A, Rodelo-Urrego M, Fraile A, Piñero D, et al. Effect
669 of biodiversity changes in disease risk: Exploring disease emergence in a plant-virus system.
670 *PLoS Pathog* 2012 ; 8: 47.
- 671 77. Alonso P, Gladioux P, Moubset O, Shih PJ, Mournet P, Frouin J, et al. Emergence of Southern
672 Rice Black-Streaked Dwarf Virus in the Centuries-Old Chinese Yuanyang Agrosystem of Rice
673 Landraces. *Viruses* 2019 ; 11 : 985.
- 674 78. McLeish MJ, Fraile A, García-Arenal F. Evolution of plant–virus interactions: host range and
675 virus emergence. *Curr Opin Virol* 2019 ; 34 : 50–55.
- 676 79. Power AG. Virus Spread and Vector Dynamics in Genetically Diverse Plant Populations.
677 *Ecology* 1991 ; 72 : 232–241.
- 678 80. Dolja V V., Krupovic M, Koonin E V. Deep Roots and Splendid Boughs of the Global Plant
679 Virome. *Annu Rev Phytopathol* 2020 ; 58 : 23-53.
- 680 81. Zhang YZ, Chen YM, Wang W, Qin XC, Holmes EC. Expanding the RNA Viroisphere by
681 Unbiased Metagenomics. *Annu Rev Virol* 2019 ; 6 : 119–139.
- 682 82. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA
683 virosphere. *Nature* 2016 ; 540 : 539–543.
- 684 83. Koonin E V., Dolja V V., Krupovic M, Varsani A, Wolf YI, Yutin N, et al. Global Organization
685 and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol Mol Biol Rev* 2020 ; 84 : e00061-
686 19.
- 687 84. Simmonds P, Adams MJ, Benkő M, Breitbart M, Brister JR, Carstens EB, et al. Consensus
688 statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 2017 ; 15: 161–168.
- 689 85. Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, et al. Methods in
690 virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.* 2014 ; 186 : 20–31.
- 691 86. Massart S, Olmos A, Jijakli H, Candresse T. Current impact and future directions of high
692 throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Res* 2014 ; 188 : 90–96.
- 693 87. Prabha K, Baranwal VK, Jain RK. Applications of next generation high throughput sequencing
694 technologies in characterization, discovery and molecular interaction of plant viruses. *Indian J*
695 *Virol* 2013 ; 24: 157–165.

- 696 88. Bronzato Badial A, Sherman D, Stone A, Gopakumar A, Wilson V, Schneider W, et al. Nanopore
697 Sequencing as a Surveillance Tool for Plant Pathogens in Plant and Insect Tissues. *Plant Dis*
698 2018 ; 102 : 1648–1652.
- 699 89. Filloux D, Fernandez E, Loire E, Claude L, Galzi S, Candresse T, et al. Nanopore-based detection
700 and characterization of yam viruses. *Sci Rep* 2018 ; 8: 1–11.
- 701 90. Boykin, Sseruwagi, Alicai, Ateka, Mohammed, Stanton, et al. Tree Lab: Portable genomics for
702 Early Detection of Plant Viruses and Pests in Sub-Saharan Africa. *Genes (Basel)*. *Genes* 2019 ;
703 10 : 632.
- 704 91. Chalupowicz L, Dombrovsky A, Gaba V, Luria N, Reuven M, Beerman A, et al. Diagnosis of
705 plant diseases using the Nanopore sequencing platform. *Plant Pathol* 2019 ; 68 : 229–238.
- 706 92. Fellers JP, Webb C, Fellers MC, Shoup Rupp J, De Wolf E. Wheat Virus Identification Within
707 Infected Tissue Using Nanopore Sequencing Technology. *Plant Dis* 2019 ; 103 : 2199–2203.
- 708 93. Naito FYB, Melo FL, Fonseca MEN, Santos CAF, Chanes CR, Ribeiro BM, et al. Nanopore
709 sequencing of a novel bipartite New World begomovirus infecting cowpea. *Arch Virol* ; 2019 ;
710 164: 1907–1910.
- 711 94. Shaffer L. Portable DNA sequencer helps farmers stymie devastating viruses. *Proc Natl Acad*
712 *Sci U S A* ; 2019 ; 116 : 3351–3353.
- 713 95. Cordoba AR, Taleisnik E, Brunotto M, Racca R. Mitigation of Tomato Spotted Wilt Vims
714 Infection and Symptom Expression by Water Stress. *J Phytopathol* 1991 ; 133 : 255–264.
- 715 96. Nachappa P, Culkin CT, Saya PM, Han J, Nalam VJ. Water stress modulates soybean aphid
716 performance, feeding behavior, and virus transmission in soybean. *Front Plant Sci* 2016 ; 7 :
717 552.
- 718 97. Dal Zotto A, Nome SF, Di Rienzo JA, Docampo DM. Fluctuations of Prunus Necrotic Ringspot
719 Virus (PNRSV) at Various Phenological Stages in Peach Cultivars. *Plant Dis* 1999 ; 83 : 1055–
720 1057.
- 721 98. Lacroix C, Renner K, Cole E, Seabloom EW, Borer ET, Malmstrom CM. Methodological
722 guidelines for accurate detection of viruses in wild plant species. *Appl Environ Microbiol* 2016
723 ; 82 : 1966–1975.
- 724 99. Kogovšek P, Kladnik A, Mlakar J, Žnidarič MT, Dermastia M, Ravnikar M, et al. Distribution
725 of *Potato virus Y* in Potato Plant Organs, Tissues, and Cells. *Phytopathology* 2011 ; 101: 1292–
726 1300.
- 727 100. Constable FE, Connellan J, Nicholas P, Rodoni BC. Comparison of enzyme-linked
728 immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction for the reliable
729 detection of Australian grapevine viruses in two climates during three growing seasons. *Aust J*
730 *Grape Wine Res* 2012 ; 18: 239–244.
- 731 101. Azizi A, Shams-Bakhsh M. Impact of cucumber mosaic virus infection on the varietal traits of
732 common bean cultivars in Iran. *VirusDisease* 2014 ; 25 : 447–454.
- 733 102. Wilson CR. *Applied Plant Virology*. Wallingford : CABI Press, 2014.
- 734 103. Byamukama E, Robertson AE, Nutter FW. Quantifying the within-field temporal and spatial
735 dynamics of Bean pod mottle virus in Soybean. *Plant Dis* 2011 ; 95 : 126–136.

- 736 104. Ramsell JNE, Lemmetty A, Jonasson J, Andersson A, Sigvald R, Kvarnheden A. Sequence
737 analyses of Wheat dwarf virus isolates from different hosts reveal low genetic diversity within
738 the wheat strain. *Plant Pathol* 2008 ; 57 : 834–841.
- 739 105. Gotelli NJ, Colwell RK. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement
740 and comparison of species richness. *Ecol Lett* 2001 ; 4 : 379–391.
- 741 106. Maclot F, Candresse T, Filloux D, Malmstrom CM, Roumagnac P, van der Vlugt RA, et al.
742 Illuminating an ecological blackbox: Using High Throughput Sequencing to characterize the
743 plant virome across scales. *Front Microbiol* 2020; 11.
- 744 107. Jiang P, Shao J, Nemchinov LG. Identification of emerging viral genomes in transcriptomic
745 datasets of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Virology* 2019 ; 16 : 153.
- 746 108. Lauber C, Seifert M, Bartenschlager R, Seitz S. Discovery of highly divergent lineages of plant-
747 associated astro-like viruses sheds light on the emergence of potyviruses. *Virus Res.* 2019 ; 260:
748 38–48.
- 749 109. Ma Y, Marais A, Lefebvre M, Theil S, Svanella-Dumas L, Faure C, et al. Phytovirome Analysis
750 of Wild Plant Populations: Comparison of Double-Stranded RNA and Virion-Associated Nucleic
751 Acid Metagenomic Approaches. *J Virol* 2019 ; 94 : e01462-19.
- 752 110. Vezzi F, Ormestad M, Dalen L, Guschanski K. Estimating the rate of index hopping on the
753 Illumina HiSeq X platform. *bioRxiv* 2017 ; 179028.
- 754 111. Galan M, Razzauti M, Bard E, Bernard M, Brouat C, Charbonnel N, et al. 16S rRNA amplicon
755 sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife. *mSystems* 2016 ; 1 : e00032-16.
- 756 112. Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M, et al. A Framework for the
757 Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and
758 Viroids Identified by NGS Technologies. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 45.
- 759 113. Massart S, Chiumenti M, De Jonghe K, Glover R, Haegeman A, Koloniuk I, et al. Virus detection
760 by high-throughput sequencing of small RNAs: Large-scale performance testing of sequence
761 analysis strategies. *Phytopathology* 2019 ; 109 : 488–497.
- 762 114. Coetzee B, Freeborough M-J, Maree HJ, Celton J-M, Rees DJG, Burger JT. Deep sequencing
763 analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 2010 ; 400 : 157–163.
- 764 115. Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a
765 fresh water lake. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7264.
- 766 116. Blouin AG, Ross HA, Hobson-Peters J, O'Brien CA, Warren B, MacDiarmid R. A new virus
767 discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus enrichment in
768 metagenomic studies. *Mol Ecol Resour* 2016;16: 1255–1263.
- 769 117. Palanga E, Filloux D, Martin DP, Fernandez E, Gargani D, Ferdinand R, et al. Metagenomic-
770 Based Screening and Molecular Characterization of Cowpea-Infecting Viruses in Burkina Faso.
771 Pooggin MM, editor. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0165188.
- 772 118. Van Regenmortel MHV. Virus species and virus identification: Past and current controversies.
773 *Infect Genet Evol* 2007 ; 7 : 133–144.
- 774 119. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Carstens EB. Recently agreed changes to the International
775 Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch Virol* 2013 ; 158 : 2633–2639.

- 776 120. Peterson AT. Defining viral species: Making taxonomy useful. *Virology* 2014 ; 11 : 1–4.
- 777 121. Lefebvre M, Theil S, Ma Y, Candresse T. The VirAnnot Pipeline: A Resource for Automated
778 Viral Diversity Estimation and Operational Taxonomy Units Assignment for Virome Sequencing
779 Data. *Phytopharmacology* 2019 ; 3 : 256–259.
- 780 122. Razzauti M, Galan M, Bernard M, Maman S, Klopp C, Charbonnel N, et al. A comparison
781 between transcriptome sequencing and 16S metagenomics for detection of bacterial pathogens
782 in wildlife. *PLoS Negl Trop Dis* 2015 ; 9 : 1–21.
- 783 123. McLeish MJ, Fraile A, García-Arenal F. Trends and gaps in forecasting plant virus disease risk.
784 *Ann Appl Biol* 2020 ; 176 : 102–108.
- 785 124. Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson J-F, Jacques M-A, Lebrun M-H, et al. Shifting
786 the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell
787 Infect Microbiol* 2014 ; 4 : 29.
- 788