



**HAL**  
open science

# Détection, caractérisation et impact d'ARN viroïde-like ou de virus de plantes chez l'homme

Jessica Grace Bengone-Abogourin

► **To cite this version:**

Jessica Grace Bengone-Abogourin. Détection, caractérisation et impact d'ARN viroïde-like ou de virus de plantes chez l'homme. Phytopathologie et phytopharmacie. Aix-Marseille Université, 2021. Français. NNT: . tel-03575947

**HAL Id: tel-03575947**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03575947>**

Submitted on 15 Feb 2022

**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 - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License



**AIX-MARSEILLE UNIVERSITE**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET SANTE - ED 62**

**IHU MEDITERRANEE INFECTION - Microbes, Evolution, Phylogeny And  
Infections MEPHI**

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE,  
ALIMENTATION ET ENVIRONNEMENT - Unité de Pathologie Végétale INRAE**

## **THESE DE DOCTORAT**

**Grade Universitaire de Docteur**

**Mention : Biologie-Santé**

**Spécialité : Maladies Infectieuses**

**Par Jessica Grace Faizath BENGONE-ABOGOURIN**

### **DETECTION, CARACTERISATION ET IMPACT D'ARN VIROÏDE-LIKE OU DE VIRUS DE PLANTES CHEZ L'HOMME**

**DETECTION, CHARACTERISATION, AND IMPACT OF VIROID-LIKE SMALL  
RNA, OR PLANT VIRUSES IN HUMANS**

**Présentée et soutenue publiquement le 01.07.2021 devant le jury :**

<b>Docteur Franck PANABIERES</b>	<b>INRAE</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Docteur Éric GALIANA</b>	<b>INRAE</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Professeur Florence FENOLLAR</b>	<b>AMU</b>	<b>Examineur</b>
<b>Professeur Philippe COLSON</b>	<b>AMU</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Docteur Éric VERDIN</b>	<b>INRAE</b>	<b>Directeur de thèse</b>

**Numéro national de thèse/suffixe local : 2021AIXM0274**



**Détection, Caractérisation et Impact D'ARN Viroïde-like ou de Virus  
de Plantes Chez L'homme**

**Detection, Characterisation and Impact of Viroid-Like Small RNA, or  
Plant Viruses in Humans**





# Préface

*Le format de présentation de cette thèse correspond à une recommandation de la spécialité Maladies Infectieuses et Microbiologie, à l'intérieur du Master de Sciences de la Vie et de la Santé qui dépend de l'École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Marseille.*

*Le candidat est amené à respecter des règles qui lui sont imposées et qui comportent un format de thèse utilisé dans le Nord de l'Europe et qui permet un meilleur rangement que les thèses traditionnelles. Par ailleurs, la partie introduction et bibliographie est remplacée par une revue envoyée dans un journal afin de permettre une évaluation extérieure de la qualité de la revue et de permettre à l'étudiant de commencer le plus tôt possible une bibliographie exhaustive sur le domaine de cette thèse.*

*Par ailleurs, la thèse est présentée sur article publié, accepté ou soumis associé d'un bref commentaire donnant le sens général du travail. Cette forme de présentation a paru plus en adéquation avec les exigences de la compétition internationale et permet de se concentrer sur des travaux qui bénéficieront d'une diffusion internationale.*

*Professeur Didier RAOULT*



# Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à **mes directeurs de thèse**,

**Pr. Philippe COLSON et Dr. Éric VERDIN** pour votre bienveillance, votre disponibilité, votre soutien et vos encouragements de concert qui me permettent de soutenir en ce jour. Vos enseignements se sont complétés sans jamais s'opposer. Ils m'ont permis d'évoluer, d'apprendre dans un cadre serein même durant les périodes les plus stressantes d'une thèse qui plus frappée par une pandémie.

**Pr. Philippe COLSON**, merci pour votre implication de tous les jours et jusqu'à la dernière heure. Pour votre soutien durant toutes les répétitions et les préparations aux sessions du WIP et les journées Méditerranées Infections.

**Dr. Éric VERDIN**, merci pour votre écoute pendant les périodes difficiles de rédaction et votre rigueur qui aura été grandement bénéfique au présent manuscrit. Pour votre accueil chaleureux à l'INRAE au sein du laboratoire de Pathologie Végétale, Montfavet, Avignon.

Aux Membres du Jury, **Dr. Franck PANABIERES et le Dr. Éric GALIANA** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse ; **Pr. Florence FENOLLAR** pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également

**Le Pr. Didier RAOULT**, pour son écoute et son soutien pendant les moments critiques de ma thèse,

**Le Pr. Bernard LA SCOLA et son équipe**, pour m'avoir m'accueilli dans l'unité de recherche des virus Géants, (Microbes, Évolution, Phylogénie et Infections, MEPHI)

**Dr Hervé LECOQ**, ancien Directeur de recherche, chargé de mission à l'INRAE, qui m'a apporté une aide inestimable en m'offrant une copie de son livre *Principes de Virologie Végétale* (Astier et al. ; 2001) couvrant des aspects de la virologie des plantes que je n'aurais pas pu rédiger sans ce livre.

**La Fondation INFECTIOPÔLE SUD** pour avoir financé mes travaux de thèse en m'octroyant la bourse INFECTIOPÔLE SUD ;

**Micheline PITACCOLO** de la fondation Méditerranée Infection, pour son accueil si chaleureux, sa gentillesse et bienveillance envers moi.

Aux **techniciens** (Annick ABEILLE, Emilie DOUDON, Catherine WIPF SCHEIBEL) et **ingénieurs** (Saïd AZZA, Malgo KOWALCZEWSKA, Claudia ANDRIEU) de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille et de l'INRAE, Montfavet (laboratoire de Pathologie Végétale).

Au **groupe ABL** (Advance Biological Laboratories), notamment, Dr. Sofiane Mohamed, Mr. Dimitri Gonzalez, Dr. Chalom Sayada pour m'avoir donné l'opportunité de valoriser les compétences acquises au cours de ma thèse et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et développement complémentaire de la recherche fondamentale.

J'aimerais remercier tout spécialement toute ma **famille qui se trouve au GABON**, qui ne pourra malheureusement pas partager ce jour très spéciale et dont je connais les prières bienveillantes à mon égard,

À ma **grand-mère BENGONE MILAME**, ma **nana Maria del Carmen**, ma tante **Colette AKOUME** qui sont mes héroïnes et modèles de vies, des exemples qui ont toujours su me guider et me conseiller, orienter mes choix et me soutenir dans toutes les épreuves « *Magnere wa* »

**Aux hommes de ma vie**, Mes **papas d'amours ABOGOURIN et ZEBIB**, mes **frères et sœurs**, mes **défunts grands-parents ROMERO, FELIN, ABOGOURIN**, pour l'amour et la présence indéfectible dont ils ont toujours fait preuve.

*Aux amis si chers de Marseille devenu une famille, aux collègues de l'IHU Méditerranée Infection et du Centre international de recherches médicales de Franceville au Gabon devenus des amis.*

Aux membres de la "**lunch and tea-time-break Team**", pour son amitié et son écoute, je pense particulièrement à Francis FOGUIM, Hervé BOGREAU, Nasseridine PAPA MZE, Marie NISHIMWE.

To my adoptive family, Grace Easy and Darryl EDGAR; Carol from St Chad's choir and to my sisters from Lady of Lourdes Maria-Rita CHINENYEM, Vera CHEN, Naomi and Alison in Birmingham and Leicester, United Kingdom.

Enfin, à ma **chorale St CHARLES-LWANGA**, le groupe ST JOSEPH, le groupe d'adoration du Bon Pasteur à Marseille que je remercie pour les gestes d'amitiés les prières aimables.



Table des matières

Préface	5
Remerciements	7
Table des matières	11
Liste de figures	15
Liste des abréviations	17
Liste des publications	20
Publié	20
Accepté	20
Article soumis pour publication	20
En cours de rédaction	20
Introduction de la thèse	21
PLAN DE LA THESE	27
PREMIERE PARTIE	30
PRESENTATION DES VIROIDES ET DES TOBAMOVIRUS	31
Introduction aux viroïdes	32
Classification	33
Organisation du génome	34
Réplication	37
Symptômes	39
Pathogénicité	41
Mode d'infection	42
Stratégies de management	42
Introduction aux tobamovirus	43
Classification	43
Gamme d'hôtes	44
Morphologie	44
Organisation du génome	45
Réplication	47
Stabilité et résistance	48
Symptômes	50
Pouvoir pathogène	52
Mode d'infection	54
Stratégies de management	55
Références	57



DEUXIEME PARTIE	83
PROJET I	84
Étude Bibliographique	85
<i>Avant-propos de la revue</i>	86
Revue	88
Article soumis pour publication dans <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i>	89
<i>Plan de Revue</i>	90
Abstract	92
Introduction	93
Genomic and structural features	94
Replication and pathogenicity	95
Putative origin	97
Hepatitis-causing delta agent: an example of viroid-like entity in humans and other animals	98
Putative presence and interactions of viroids, viroid-like entities or their short derived RNAs in animals including humans	100
Conclusion	104
References	105
PROJET II	132
Recherche <i>in silico</i> de séquences viroïde-like chez l'homme	133
<i>Avant-propos</i>	134
Article bio-informatique	137
Article publié dans <i>Intervirology</i>	138
Discussion	147
References	148
PROJET III	150
Travail de recherche	151
<i>Avant-propos du Travail de recherche</i>	152
Introduction	155
Materials and Methods	156
Results	158
Discussion	160
Figure 16	162
Figure 17	163
Figure 18	164
Figure 19	165

Figure 20	166
Figure 21	167
Figure 22	168
Table 1.	169
References	170
PROJET IV	174
Travail de recherche	175
<i>Avant-propos du Projet IV</i>	176
Article de Recherche	178
Introduction	180
Materials and Methods	181
Results and Discussion	183
Figure 23	186
Figure 24	187
Figure 25	188
Figure 26	189
Figure 27	190
Figure 28	192
Table 2.	193
Table 3.	194
References	195
PROJET V	198
Introduction	200
References	205
Travail de Recherche 1	209
Article de Recherche 1	210
Article accepté dans <i>Annals of Clinical Medicine</i>	211
To the Editor:	213
Figure Legend	217
Figure 1	218
References	219
Travail de Recherche 2	221
Article de Recherche	222
Article à soumettre pour publication	223
Case report	226
Figure legends	230
Figure 1	231

Figure 2	232
References	233
TROISIEME PARTIE	235
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	236
References	245

# Liste de figures

Figure 1: Représentation des deux conformations tige-boucle et tête de marteau différenciant les <i>Pospiviroidae</i> des <i>Avsunviroidae</i> .....	34
Figure 2: Représentation des cinq domaines caractéristiques du génome des <i>Pospiviroidae</i> .....	35
Figure 3: Structure génomique chez quelques espèces d' <i>Avsunviroidae</i> .....	36
Figure 4: Schéma représentant le mode de réplication en cercle roulant asymétrique dans le noyau chez les <i>Pospiviroidae</i> .....	37
Figure 5: Schéma représentant le mode de réplication en cercle roulant symétrique dans le chloroplaste chez les <i>Avsunviroidae</i> .....	38
Figure 6: Symptômes associés au <i>Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)</i> observés sur les racines et les fruits des tomates .....	39
Figure 7: Symptômes « mild » ou modérés causés par le <i>Tomato apical stunt viroid (TASVd)</i> sur des feuilles de tomates infectées (INRAE, Montfavet) .....	40
Figure 8: Symptômes « mild » causés par le <i>Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)</i> sur les feuilles de <i>Nicotiana tabacum cv. Xanthi</i> infectés (INRAE, Montfavet) .....	40
Figure 9: Pathogénicité des viroïdes chez les plantes est similaire au mécanisme d'ARN interfèrent .....	42
Figure 10: Représentation de la particule virale du <i>tobacco mosaic virus</i> .....	45
Figure 11: Génome du <i>tobacco mosaic virus (TMV)</i> représentatif des <i>tobamovirus</i> .....	46
Figure 12: Représentation de la réplication de l'ARN génomique (ARNg) des <i>tobamovirus</i> .....	48
Figure 13: Symptômes du ToBRFV chez la tomate .....	51
Figure 14: Symptômes de tobamovirus (ToMV et TMV) .....	52
Figure 15: Représentation de l'interaction de l'appariement des viroïdes à la région « seed » retrouvé au niveau des domaines 3' et 5' des miRNAs humains (hsa-miRNAs) de la cellule hôte .....	135
Figure 16: Overall protocol workflow .....	162
Figure 17: Developing viroids positive controls for NGS experiment .....	163
Figure 18 : Clinical and plant samples Quantification data after RNA extraction and DNase treatment .....	164

**Figure 19: Polyacrylamide Gel 1 and 2 before and after sample cut of amplified libraries following Illumina library amplification and TruSeq Small RNA Library Prep of selected patients and plants samples; before NGS sequencing step....**165

**Figure 20: Bioanalyzer electropherogram DNA library profiles (Agilent 2100 Bioanalyzer system) of the 6 selected clinical samples after library preparation and size selection.....**166

**Figure 21: Bioanalyzer electropherogram DNA library profiles (Agilent 2100 Bioanalyzer system) of the 4 selected plant samples after library preparation and size selection .....**167

**Figure 22: Distribution of read lengths for the human plasma sample and the plant samples .....**168

**Figure 23: Collected sample types involved in the study.....**186

**Figure 24: Processing steps of tomato sauces dry chili pepper samples from collection to analyses (RT-PCR and sequencing) .....**187

**Figure 25: RT PCR results of positive Panzani sauce using two different primer sets.....**188

**Figure 26: Inoculated plants using positive and negative ketchup and pasta Panzani sauces detected by RT-PCR and Sanger sequencing. A-D: inoculated plants on the first day of inoculation. E, F and H: inoculated plants 5 weeks after inoculation.....**189

**Figure 27: Phylogenetic reconstructions based on the replicase gene of tobamoviruses.....**190

**Figure 28: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR results of RNA extracts from pool of (fresh tomatoes pool, pool of RNA extracts) on inoculated host sensitive plants .....**192

# Liste des abréviations

<b>Acronymes</b>	<b>Titres</b>
<b>AGO</b>	Argonaute endonucléases
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>Anti-HBV</b>	Hepatitis B surface antibody
<b>APREL</b>	Association Provençale de Recherche et d'Expérimentation Légumière
<b>ARNg</b>	ARN génomique
<b>ARNi</b>	ARN interférence
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal
<b>ASBVd</b>	Avocado sunblotch viroid
<b>BLASTn</b>	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	Basepairs
<b>cccRNA</b>	Covalently closed circular RNA
<b>CCCvd</b>	Coconut cadang-cadang viroid
<b>CChMVd</b>	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid
<b>CCR</b>	Central conserved region
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CEVd</b>	Citrus exocortis viroid
<b>CLC</b>	QIAGEN CLC Genomics Workbench
<b>COVID-19</b>	Coronavirus disease 2019
<b>CP</b>	Capsid protein/Protéine de coque ou capsid
<b>CRISPER-Cas 9</b>	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats cas 9 enzymes
<b>CRISPR</b>	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<b>CSVd</b>	Chrysanthemum stunt viroid
<b>Dicer-like 4</b>	Splicing enzyme
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (collection nationale allemande de microorganismes et de cultures microbiologiques)
<b>dsRNA</b>	Double stranded RNA
<b>ELVd</b>	Eggplant latent viroid
<b>HBsAg</b>	Hepatitis B surface antigen
<b>HBV</b>	Hepatitis B virus
<b>HDV</b>	Hepatitis delta virus

<b>HHR</b>	Hammerhead region
<b>HLVd</b>	Hop latent viroid
<b>Hsa-miRNA</b>	Homo-sapiens microRNA
<b>HSVd</b>	Hop stunt viroid
<b>ICTV</b>	International Committee on Virus Taxonomy
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>IgM</b>	Immunoglobulin M
<b>IHU MI</b>	Institut hospitalo-universitaire Méditerranée Infection
<b>INRAE</b>	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
<b>IU/L</b>	International units (IU) par litre (L)
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LRR</b>	Loop-rich region
<b>mb</b>	Megabase
<b>ml</b>	Millilitre
<b>MP</b>	Protéine de mouvement
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NGS</b>	Next generation sequencing
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>nt</b>	Nucleotides/ nucléotides
<b>OEPP</b>	Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
<b>ONT</b>	Oxford Nanopore technology
<b>P</b>	Pathogenicity domain
<b>PLMVd</b>	Peach latent mosaic viroid
<b>PLVd</b>	Peach latent viroid
<b>PMMoV</b>	Pepper Mild Mottle Viroid
<b>PSTVd</b>	Potato Spindle Tuber viroid
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative or real time reverse transcription polymerase chain reaction
<b>RdRP</b>	RNA-dependent RNA polymérase
<b>REP</b>	Replication proteine
<b>RISC</b>	RNA interfering silencing complex
<b>RISC</b>	
<b>complexe</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RNA Pol II</b>	RNA-dependant RNA polymerase II
<b>RNAse</b>	Enzyme ribonucléase
<b>RNA-Seq</b>	RNA sequencing
<b>RT PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction

<b>SARS-CoV-2</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>TASVd</b>	Tomato Apical stunt viroid
<b>TCDVd</b>	Tomato chlorotic dwarf viroid
<b>TL</b>	Terminal Left
<b>TMV</b>	Tobacco Mosaic Virus
<b>ToBRFV</b>	Tomato Brown Rugose Fruit Virus
<b>ToMV</b>	Tomato Mosaic Viroid
<b>TR</b>	Terminal right
<b>tRNA ligase</b>	Enzyme ligase tRNA
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>vRNA</b>	Viral ARNs





# Liste des publications

## Publié

1. **Bengone-Abogourin JG**, Chelkha N, Verdin E, Colson P. Sequence Similarities between Viroids and Human MicroRNAs. *Intervirology* 1–8, 2020

## Accepté

1. Philippe Colson, Céline Boschi, **Jessica Bengone-Abogourin**, Ludivine Brechard, Anne Motte, Isabelle Allemand. Concurrent Nanopore next-generation sequencing of hepatitis B and delta virus genomes directly from a patient plasma sample. Accepté dans *Annals of Laboratory Medicine*, 2020

## Article soumis pour publication

1. **Bengone-Abogourin JG**, Verdin E, Colson P. May viroid-like entities be present in humans? Soumis dans *Annals of the New York Academy of Sciences*

## En cours de rédaction

1. **Bengone-Abogourin JG**, Rolland C, Andrieu C, Azza S, Andrianjakarivony H, Verdin E, Colson P. Detecting viroid-like small RNAs in clinical samples by next-generation sequencing.
2. **Bengone-Abogourin JG**, Verdin E, Colson P. Presence of tobamoviruses in tomato-derived food products.
3. Marc-Antoine Giordan, **Jessica Grace Bengone-Abogourin**, Sarah Aherfi, Isabelle Allemand, Philippe Colson. Hepatitis delta treatment with bulevirtide in real life: a case report. Article à soumettre prochainement.



# Introduction de la thèse

La connaissance des maladies infectieuses et de leurs agents causals s'est affinée au fil des décennies avec des périodes d'accélération importante des connaissances. Ces avancées ont souvent reposé sur des progrès technologiques mettant à disposition de nouveaux outils autorisant des nouvelles découvertes (Raoult, 2010). Même si le niveau de technologie des dernières décennies a atteint des niveaux élevés, avec le plus récemment la mise au point des technologies de séquençage à haut débit permettant des études de métagénomique dont le nombre a été considérable, il reste des trous de connaissance apparemment importants. Cette méconnaissance du monde des agents infectieux peut être en partie liée à des obstacles à la découverte de nouveaux agents infectieux qui ont pu reposer sur de l'aveuglement, c'est-à-dire des a priori voire des dogmes empêchant d'observer ou de considérer certains agents infectieux car ils possédaient des caractéristiques différentes de celles définissant les agents infectieux précédemment décrits. Des exemples de découvertes inattendu au cours du XXI<sup>e</sup> siècle ont ainsi été la découverte des virus géants d'une part et des Candidate Phyla Radiation (CPR) (Brown et al., 2015) et des nanoarchées (Brett et al., 2010) d'autre part. Le premier virus géant, Mimivirus, a été découvert en 2003, 11 ans après qu'il a été isolé à partir de l'eau d'une tour de climatisation prélevée lors de l'investigation d'une épidémie de pneumonie en Angleterre (La Scola et al., 2003). Il a été pendant plusieurs années considéré comme un coccus à Gram positif, donc une bactérie, puisqu'il n'était pas envisagé qu'un virus puisse être visible au microscope optique est d'une taille similaire à celle de petites bactéries (Raoult et al., 2007). Quelques années plus tard les CPR et les nanoarchées ont été découvertes. Ils avaient été négligés jusqu'alors puisqu'il n'était pas envisagé que des organismes cellulaires comme les bactéries ou les archées puissent être d'une taille inférieure à 200  $\mu\text{m}$ , similaire à celle de certains virus, et par conséquent invisibles au microscope optique.

Or les CPR représentent en nombre plus de 15% du monde bactérien, et leur découverte date de 2015 (Brown et al., 2015). Ceci suggère que la découverte d'autres agents infectieux de natures différant de celles des agents actuellement connus est possible voire probable à court terme. Un autre élément ayant pu ralentir la découverte de nouveaux agents infectieux est une compartimentalisation des champs d'études relativement à la formation et aux compétences des chercheurs et de leurs équipes.

Il est admis aujourd'hui qu'il y a une vraie scission entre les mondes de la virologie animale et végétale, se traduisant par un nombre limité d'études d'une part sur l'existence et l'impact des agents phytopathogènes sur le monde animal, et en « particulier les vertébrés », et d'autre part d'agent pathogènes décrits dans le monde animal affectant les végétaux. Les viroïdes et les viroïdes-like ARN satellites sont des agents infectieux qui ne sont pas classés comme étant des virus, mais comme des agents sous-viraux. Les viroïdes et certains genre viraux pathogènes de plantes, en particulier les *tobamovirus*, sont très stables dans l'environnement, pouvant résister à des contraintes fortes comme le processus de digestion ou même la transformation agroalimentaire. Viroïdes et tobamovirus peuvent se propager par simple contact physique à partir de matériel végétal. Ainsi, les outils, structures et véhicules agricoles ayant été en contact avec ces agents pathogènes peuvent rester infectieux sur de longues périodes. Transmis par les semences, ils peuvent se propager rapidement dans le monde entier en raison de la fréquence et du volume important des échanges internationaux. Des protocoles réglementaires de désinfection de semences sont appliqués dans de nombreux pays pour limiter leur dissémination. Ces éléments suggèrent une exposition de l'Homme aux viroïdes et aux *tobamovirus* via l'alimentation, en particulier les fruits et légumes, et aux activités liées à l'agronomie. Si des travaux de recherches ont déjà associé les tobamovirus à des signes cliniques et à une réponse immunitaire chez l'Homme (Balique et al., 2013, 2012; Colson et al., 2010), aucune étude n'a à ce jour mentionné un impact possible des viroïdes, ou des

structures proches des viroïdes, sur la santé des animaux et en particulier sur celle des vertébrés.

Du fait de la compartimentation marquée entre la virologie humaine et végétale, très peu d'études ont exploré l'existence de passerelles entre ces deux disciplines. Les travaux présentés ici ont principalement tenté d'apporter des éléments concernant la présence chez l'homme d'entités viroïde-like. Les viroïdes sont des particules rencontrées exclusivement chez les plantes et composés exclusivement d'un génome très court. L'agent delta, responsable d'une forme d'hépatite, contient un fragment de type viroïde qui pourrait être relié aux viroïdes. Ce type particulier d'acide nucléique infectieux pourrait possiblement en cas de présence chez l'homme interagir avec les acides nucléiques humains, notamment les ARN messagers, étant donné que chez les plantes leur pouvoir pathogène semble relié au phénomène d'interférence. D'autres virus de plantes particulièrement stable, et en particulier les tobamovirus, ont déjà été mis en évidence dans des produits alimentaires et aussi chez l'homme. Dans cette étude, nous avons également recherché ces virus dans des sauces tomates et des échantillons cliniques. Pour mener bien ces recherches, des approches *in silico* et moléculaires, comme le séquençage de nouvelle génération, ont été utilisées afin d'étudier l'interactions de ces agents pathogènes chez l'humain.

Le thème général de la thèse est l'étude/recherche et la caractérisation de la présence chez l'homme des entités viroïde-like et de virus de plantes.

Pour approfondir cette recherche, nous l'avons orienté autour de quelques questions principales :

1. Retrouve-t-on dans la littérature des viroïdes ou éléments qui se rapprochent aux viroïdes en dehors du monde végétal, par exemple chez les mammifères dont l'Homme ?

- a. Ces entités seraient-elles à l'origine de toutes les formes existantes d'ARNs dans le monde des vivants ?
  - b. Existerait-il un ou des mécanismes de pathogénicité associé à ces petits ARNs nus chez l'homme ?
  - c. Quel serait l'impact possible des viroïdes, ou des structures proches des viroïdes, sur la santé des animaux ? Sur celle des vertébrés ?
2. Les résultats encourageants de la littérature nous ont conduits à nous poser les questions suivantes : existerait-il réellement des similitudes ou homologies de séquences entre les viroïdes et des régions d'interférences chez les petits ARNs non-codant humains ? *in silico* ? *in vitro* ?
  3. Retrouve-t-on d'autres virus de plantes chez l'Homme et dans son alimentation? L'hypothèse de la présence de tobamovirus, virus dotés d'une grande stabilité, a été explorée.
  4. Enfin, nous avons conclu ces travaux par la détection de l'agent Delta « viroïde-like » chez les l'Homme en utilisant des outils de biologie moléculaire et le séquençage à haut débit.

Les travaux réalisés au cours de cette Thèse sont exploratoires et ont porté sur divers aspects d'une présence possible d'agent infectieux des plantes, d'une part des viroïdes ou des agents similaires à ceux-ci mais présents en dehors du règne végétal, et d'autre part des virus de plantes très stables qui sont les tobamovirus. La possibilité d'une présence chez l'homme de viroïdes ou bien d'entités comparables pouvant causer des infections ou interagir avec les cellules humaines n'a quasiment pas été explorée à ce jour du constat même de Theodore Diener, le découvreur des viroïdes (Diener, 2016). Des travaux portant sur l'agent Delta, un agent d'hépatite chez l'homme et qui présente des similarités de structure avec les viroïdes, ont complété cette partie. Concernant les tobamovirus les travaux réalisés au cours de cette thèse prolongent les travaux précédents réalisés dans le laboratoire montrant la présence de

PMMoV dans des produits alimentaires et dans les selles de patients et du virus de la mosaïque de tabac dans les cigarettes et dans la salive de fumeurs (Baliq et al., 2015a). De plus, une revue de la littérature avait par ailleurs montré que des virus de plantes avaient été en fait détectés chez divers animaux incluant l'homme (Baliq et al., 2015a).

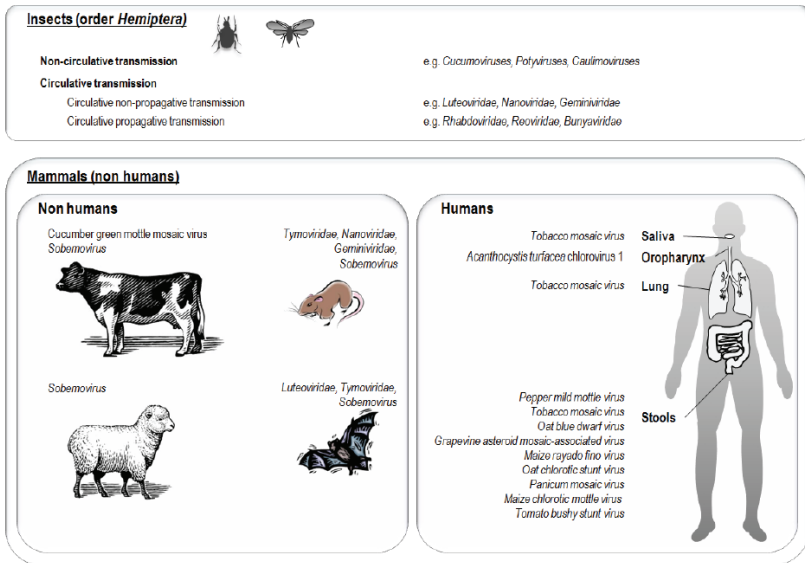


Figure 3. Detection of plant viruses in insects and mammals including humans.

(Baliq et al., 2015a)

Ainsi, dans leur ensemble, les travaux réalisés au cours de cette Thèse, bien que s'intéressant à des agents infectieux différents et abordant cette thématique par plusieurs approches différentes, représentent plusieurs pistes de niveaux de difficulté et d'originalité différents, explorées de façon indépendante mais complémentaire,



visant à globalement augmenter le niveau d'évidence sur la présence d'entités viroïde-like et de pathogènes de plantes chez les animaux dont l'homme.

# PLAN DE LA THESE

Cette thèse est organisée en trois parties. Une première partie introductive restitue le travail dans un contexte général et fait un focus sur les viroïdes et les tobamovirus. Les projets I, II, III, IV et V intégrés dans la deuxième partie présentent les travaux de thèse sous forme d'articles parus, soumis ou en cours de rédaction. Chaque projet est introduit par un avant-propos rappelant les objectifs poursuivis. La troisième et dernière partie une conclusion générale et perspectives.



La première étape de ce travail permet de dresser un état de l'art sur les viroïdes et les tobamovirus.

Une synthèse bibliographique (Bengone-Abogourin et al., 2021 ; article soumis) fait ensuite l'objet de la première partie du manuscrit appelée projet I.

Aucune étude n'ayant jusqu'ici recherché la présence de viroïdes et d'ARN assimilés chez les animaux, nous avons recherché dans un deuxième temps par des analyses *in silico* des similitudes entre les viroïdes et les petits ARN chez l'homme (Projet II). Nous nous sommes intéressés en particulier aux micro-ARN matures humains. Nous avons recherché les similarités de séquences entre les génomes de viroïdes et les séquences de micro-ARN matures humains en croisant la base de données de viroïdes disponible sur NCBI avec la base de données des micro-ARN humains MIRBase.

Au regard des résultats, nous avons utilisé des outils de biologie moléculaire pour rechercher des agents phytopathogènes à partir d'échantillons humains. Nous avons tenté de retrouver des viroïdes dans le sang humain utilisant le séquençage haut débit est présentée dans la troisième partie (Projet III).

Enfin, la recherche d'agents phytopathogènes s'est étendue à des virus très stables, les tobamovirus, dans les aliments en privilégiant une approche par RT-PCR et de séquençage de Sanger qui sera abordée dans le Projet IV.

Finalement, le projet V met en évidence la détection des génomes de l'agent Delta, un agent causal d'hépatite virale qui possèdent un motif viroïde-like, et concomitamment du virus de l'hépatite B en utilisant la technologie de séquençage Nanopore dite de troisième génération, et analyse l'impact d'un nouvel agent antiviral sur la réplication de l'agent Delta.



# PREMIERE PARTIE



# **PRESENTATION DES VIROIDES ET DES TOBAMOVIRUS**

Nous présentons ici, en support des travaux réalisés au cours de cette Thèse, les caractéristiques principales des viroïdes d'une part, et des tobamovirus d'autre part.





## Introduction aux viroïdes

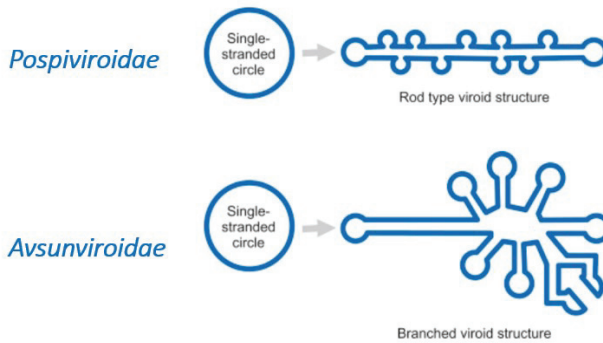
Les viroïdes sont des parasites intracellulaires sous-viraux infectant uniquement les plantes monocotylédones et dicotylédones, herbacées et ligneuses. On retrouve les viroïdes à la fois chez des espèces sauvages ornementales ou des plantes cultivées (Di Serio et al., 2014, 2017; Flores, 2001a; Kovalskaya and Hammond, 2014). Exclusivement décrits dans les systèmes végétaux, ils ont été recherchés principalement dans les plantes d'intérêt agronomique pour l'homme comme la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Antignus et al., 2007, 2002; Piernikarczyk, 2016), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Piernikarczyk, 2016; Yanagisawa et al., 2019), la noix de coco (*Coco Nucifera*) (Flores, 2001a) et d'autres espèces de consommation (Antignus et al., 2002; Candresse et al., 2007a; Dall et al., 2019; Hammond and Owens, 2006; Verhoeven et al., 2006, 2017a) ou d'ornement (pétunia, chrysanthèmes) (Glouzon, 2013; Hammond and Owens, 2006; Verdin et al., 2017; Yanagisawa et al., 2019).

## Classification

Les viroïdes sont répartis dans deux familles, les *Pospiviroidae* et *Avsunviroidae*, subdivisées en cinq genres, respectivement *Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Apscaviroid*, *Cocadviroid*, *Coleviroid* et trois genres *Avsunviroid*, *Pelamoviroid*, *Elaviroid* (Di Serio et al., 2017; T. Diener, 2016). Les viroïdes comptent près de 40 espèces connues. Le nom des *Pospiviroidae* provient du premier viroïde découvert en 1971 par T.O Diener, le *Potato Spindle Tuber viroid* (PSTVd) et le nom *Avsunviroidae* provient de l'*Avocado Sunblotch viroid* (ASBVd) (Di Serio et al., 2018; T. Diener, 2016; Diener, 1971; Flores, 2001a). Le *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) chez le chrysanthème, le PSTVd chez la pomme de terre, le *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) chez le cocotier, le *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) chez la tomate et le *Citrus exocortis viroid* (CEVd) appartenant à la famille des *Pospiviroidae*; et le *Peach latent viroid* (PLVd) chez le pêcher, le *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) chez les chrysanthèmes et le ASBVd chez l'avocat appartenant à la famille des *Avsunviroidae*, sont des espèces associées à des maladies particulièrement surveillées (Kovalskaya and Hammond, 2014).

Trois caractéristiques principales différencient ces deux familles de viroïdes : leur structure secondaire, l'organisation des domaines génomiques et leur mode de réplication autonome.

Leurs structures secondaires en tige-boucle ou bâtonnet sont caractéristiques des *Pospiviroidae* alors que la structure en tête de marteau est associée aux *Avsunviroidae* (Figure 1) (Flores, 2001a).



**Figure 1: Représentation des deux conformations tige-boucle et tête de marteau différenciant les *Pospiviroidae* des *Avsunviroidae***

(Image Modifiée tirée de Clark et al., Molecular Biology, 2019) (Clark et al., 2019).

## Organisation du génome

Les viroïdes sont composés uniquement d'un ARN génomique monocaténaire non codant dont la taille très courte varie entre 246 et 475 nucléotides (nt) de long (Yanagisawa et al., 2019). Les viroïdes sont non-encapsidés et non-enveloppés (Gas et al., 2007; Messmer et al., 2017; Piernikarczyk, 2016; Yanagisawa et al., 2019). L'ARN génomique des viroïdes a une composition élevée en bases guanine et cytosine leur permettant de s'apparier et de se refermer sur eux-mêmes prenant différentes conformations en épingle à cheveux (« stem-loop »), en « tetraloop », « pseudo-loop » avec ou sans embranchement (Gas et al., 2007). De plus, la composition élevée en bases guanine et cytosine confère une stabilité au génome et une résistance physique à la chaleur ainsi qu'aux rayonnements ultraviolets et ionisants (Diener and Owens, 1980). La grande stabilité des viroïdes leur permet de résister à des conditions environnementales difficiles même en dehors de la cellule hôte (Roger, 2011).

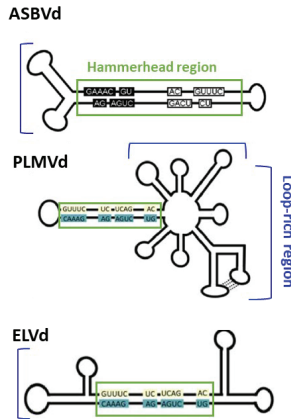
L'organisation du génome est un critère important différenciant les deux familles. La présence du motif conservé de la région centrale (central conserved region, CCR) (Figure 2) est décrite uniquement chez les *Pospiviroidae*. Ce motif, qui comprends cinq domaines distincts et joue un rôle primordial au cours du cycle de réplication (Di Serio et al., 2017; Flores, 2001a). La CCR est impliquée dans la spécificité d'hôtes, la réplication et le caractère pathogénique (Flores, 2001a). Les domaines « terminal Left, TL », « terminal right, TR » et « Variable domain, V », sont conservés et sont caractéristiques des *Pospiviroidae*. La région de pathogénicité « pathogenicity domain, P » est impliquée dans la virulence envers l'hôte. Elle est spécifique d'un viroïde à l'autre (Flores, 2001a; Roger, 2011) (Figure 2).



**Figure 2: Représentation des cinq domaines caractéristiques du génome des *Pospiviroidae***

Domaine terminal gauche (TL), la région Centrale conservée (CCR), le domaine variable (Variable), le domaine de pathogénicité (Pathogenicity).

Le génome des *Avsunviroidae* se définit par deux domaines. Un domaine en tête de marteau « Hammerhead region, HHR », responsable d'une activité de type ribozyme-like-auto-clivante. Cette activité ribozyme auto-clivante est décrite uniquement chez les *Avsunviroidae* (Di Serio et al., 2018). Un autre domaine riche en tige-boucles « loop-rich region, LRR » présent chez les *Avsunviroidae* possède un pourcentage de guanine-cytosine supérieur à celui retrouvé dans la région en tête de marteau (Di Serio et al., 2017; Messmer et al., 2017) (Figure 3).



**Figure 3: Structure génomique chez quelques espèces d'*Avsunviroidae***

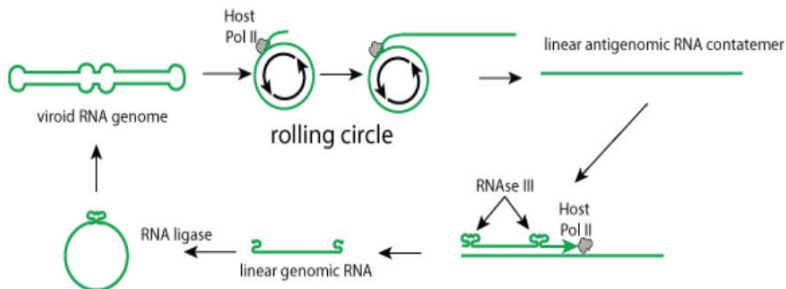
En vert la region ribozyme auto-clivantes « Hammerhead region » et en bleu la région riche en boucles (loop-rich region). L'Avocado Sunblotch viroid (ASBVd) du genre *Avsunviroid*, le Peach latent mosaic viroid (PLMVd) du genre *Pelamoviroid* et l'Eggplant latent viroid (ELVd) du genre *Elaviroid* (Image adaptée de Di Serio et al., *Viroid Taxonomy* 2017)

Chez les *Avsunviroidae*, l'ARN génomique en tête de marteau possède des structures communes aux ARN catalytiques de type ribozyme. À partir d'analyses phylogénétiques couplées aux caractéristiques biochimiques des viroïdes, il a été proposé par Bussière et al. que le viroïde du pêcher (PLMVd) disposant d'un ARN auto-répliquant avec une activité ribozyme-like pourrait correspondre à un fossile moléculaire, datant du monde « pré-cellulaire » (Bussière et al., 1995; Roger, 2011), preuve encore vivante d'un "monde ARN pré-cellulaire" (Flores, 2001a; Friday, 2017; López-Carrasco and Flores, 2017; Moreno et al., 2019). En 1989, T.O. Diener avait déjà suggéré que les viroïdes pourraient être des « fossiles vivants » préexistants bien avant l'apparition des ARNs cellulaires (ribosomale, messenger et de transfert), de l'ADN et

des protéines, faisant ainsi des viroïdes des ancêtres archaïques à l'origine du « monde ARN » (Flores, 2001a; Seligmann and Raoult, 2016) et à l'origine de la vie (Moreno et al., 2019).

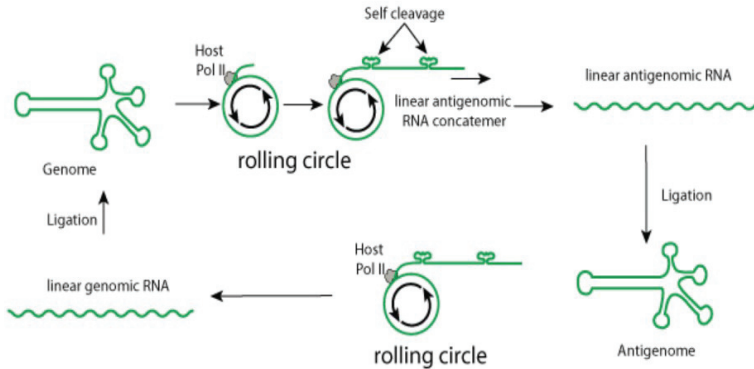
## Réplication

Dans les cellules végétales, le mode de réplication autonome en cercle roulant chez les *Pospiviroidae* est asymétrique avec une localisation nucléaire (Figures 4). Chez les *Ausunviroidae*, la réplication en cercle roulant est symétrique et a lieu dans le chloroplaste (Figure 5) (Di Serio et al., 2018; Flores, 2001b).



**Figure 4:** Schéma représentant le mode de réplication en cercle roulant asymétrique dans le noyau chez les *Pospiviroidae*

À partir d'un ARN circulaire simple brin positif (covalently closed circular RNA « cccRNA ») ; la RNA polymérase RNA dépendante cellulaire (RNA-dependant RNA polymerase II « RNA Pol II ») synthétise les brins négatifs. Ces brins négatifs sont utilisés comme matrice pour produire des ARN génomiques positifs qui sont ensuite circularisés par la RNA ligase1 (<https://viralzone.expasy.org/6956>).



**Figure 5: Schéma représentant le mode de répllication en cercle roulant symétrique dans le chloroplaste chez les *Avsunviroidae*.**

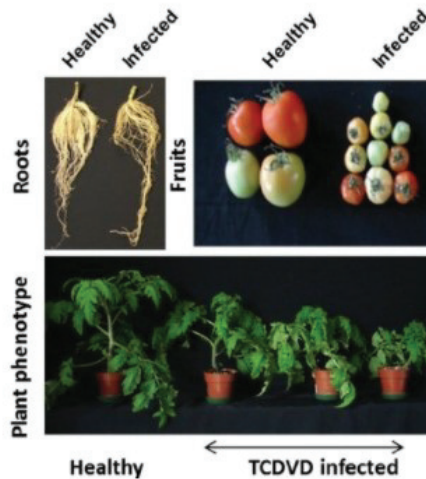
La RNA polymérase RNA dépendante cellulaire (RNA Pol II) synthétise les brins ARN de polarité négative (anti-génomique RNA). Le brin positif est synthétisé en long brin qui s'auto-découpe en petit ARN par son activité catalytique de type ribozyme et se circularise. Les longs brins négatifs sont générés à partir des ARN positifs, découpés par les activités ribozymes et sont circularisés (Image de <https://viralzone.expasy.org/1944>).

De plus amples explications sur le cycle de répllication des deux familles de viroïdes sont détaillées dans la revue présentée dans le projet I qui se trouve dans la deuxième partie de ce manuscrit.



## Symptômes

Les viroïdes peuvent être associés à des symptômes agressifs sévères pouvant modifier la croissance de la plante et sa morphologie (rabougrissement, formes cylindriques, allongées, crevassées, rugueuses,...), la couleur des feuilles, pétioles, tiges, et fruits (décoloration, marbrure, chlorose, jaunissement, taches brunes auréolées, couleur rouilles...) ( Mackie et al., 2019; Roger, 2011) (Figure 6).



**Figure 6: Symptômes associés au *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) observés sur les racines et les fruits des tomates**

(Sangha et al., 2015)

D'autres symptômes moins sévères (« mild ») peuvent être rencontrés comme des gaufrages des feuilles ou des ponctuations foliaires (Figure 7 et 8).

## Tomate 'monalbo'

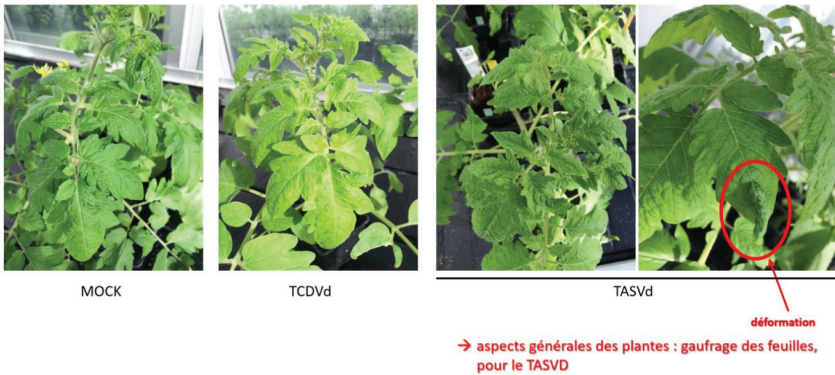


Figure 7: Symptômes « mild » ou modérés causés par le *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) sur des feuilles de tomates infectées (INRAE, Montfavet)

## Nicotiana tabacum cv. Xanthi

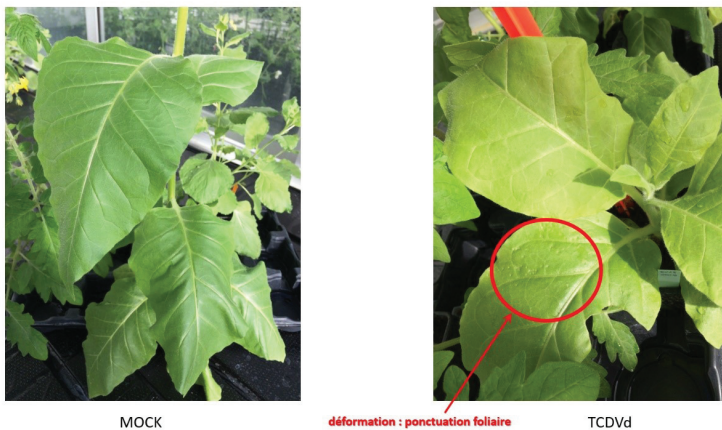
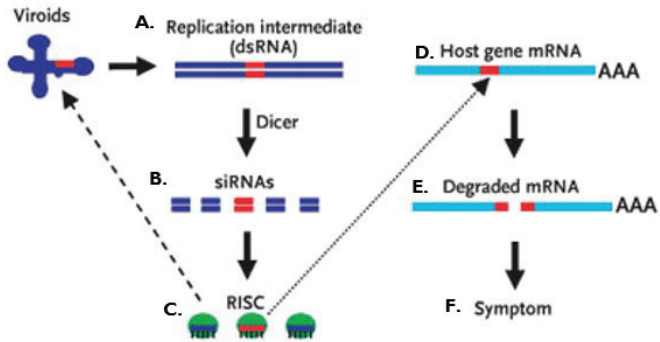


Figure 8: Symptômes « mild » causés par le *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) sur les feuilles de *Nicotiana tabacum cv. Xanthi* infectés (INRAE, Montfavet).

Enfin certains viroïdes ne sont associés à aucun symptôme, c'est le cas du *Hop latent viroid* (HLVd) chez le houblon (Roger, 2011).

## Pathogénicité

Les viroïdes détournent le processus post-transcriptionnel du gene silencing, mécanisme de défense bien connu chez les plantes» (Kurihara et al., 2007; Smith and Dombrovsky, 2019). Ce mode de défense a également été décrit chez les champignons et certains invertébrés (Jiang et al., 2012). Tout d'abord, les viroïdes se répliquent en détournant l'ARN polymérase de la cellule hôte. La réplication des viroïdes génère des ARN double brins intermédiaires, qui sont découpés par des exonucléases « Dicer » en petits ARN interférents, ou siRNA, de 21 à 25 nucléotides de long (Dadami et al., 2017; Dalakouras et al., 2013) (Figure 9). Ces siRNA double-brin sont ensuite incorporés au sein d'un complexe RISC (« RNA-induced silencing complex » ayant une activité siRNA ribonucléase). Si les séquences de siRNA correspondent aux ARN messagers de l'hôte, les RISC peuvent les cibler conduisant à une dégradation menant à l'apparition de symptômes chez la plante hôte (Figure 9). Les RISC peuvent également cibler le viroïde, le forçant à évoluer, pour adopter et maintenir une structure résistante au silencing de l'ARN (Wang et al., 2004).



**Figure 9: Pathogénicité des viroïdes chez les plantes est similaire au mécanisme d'ARN interfèrent**

(A) Les viroïdes détournent les protéines impliquées dans le « RISC complex » pour se répliquer (A), former des siRNA (B), incorporer le RISC (C) et (D et E) cibler une dégradation de l'ARN messager de l'hôte (D et E) menant à l'apparition de symptômes (F) (Wang et al., 2004).

### Mode d'infection

Les contacts mécaniques comme le greffage ou la manipulation d'outils contaminés, le transport commercial des semences et des jeunes plants infectés, sont les voies de transmission principales des viroïdes chez les plantes hôtes (Kovalskaya and Hammond, 2014; "L'Anses lance l'alerte," n.d.).

### Stratégies de management

Dans le cas d'infection par un viroïde, les moyens de lutte sont limités. Aucun traitement curatif n'étant efficace ("ANSES/LSV/MA034 - Version 2," n.d.), seules des mesures de prophylaxie sont utilisées, avec en particulier l'utilisation de semence et de plants sains, et le respect des procédures suivant un cahier des charges bien défini (désinfection des outils, port de gants et de vêtements de protection,...). En cas d'infection, la destruction des plants atteints doit être effectuée.

## Introduction aux tobamovirus

L'étude des tobamovirus est étroitement associée à la découverte des virus. À la fin du 19<sup>ème</sup> siècle Ivanovsky a décrit l'existence d'agents pathogènes plus petits que les bactéries après filtration de feuilles de tabac présentant les signes de la maladie de la mosaïque du tabac au travers un filtre de Chamberland. En reprenant les expériences de Ivanovsky, Beijerinck montrera ensuite que cet agent infectieux, nommé 'contagium vivum fluidum', est capable de se multiplier en infectant les feuilles de tabac. Cette découverte correspond à la description du premier virus et connu sous le nom d'espèce *Tobacco mosaic virus* (TMV), aujourd'hui rattaché au genre *Tobamovirus*. Depuis, les tobamovirus sont devenus des modèles expérimentaux incontournables pour étudier les caractéristiques morphologiques et structurales des virus, leur cycle, l'évolution des virus, en particulier leur capacité à s'adapter à des hôtes variés (Fraile and García-Arenal, 2018).

## Classification

Les phytovirus du genre *Tobamovirus* appartiennent à la famille des *Virgaviridae*. Les tobamovirus regroupent plus d'une trentaine d'espèces et sont les seuls membres de cette famille à posséder un génome non-segmenté. ("Genus," n.d.).

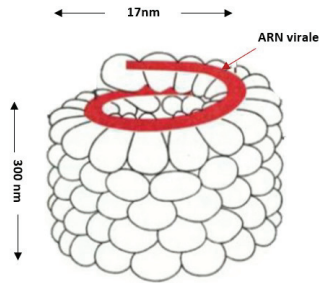
Les virus du genre *Tobamovirus* infectent plus particulièrement les plantes de la famille des *Solanaceae*, des *Cucurbitaceae* et des *Brassicaceae* dont certaines sont abondamment cultivées, en particulier des plantes légumières comme la tomate, le poivron/piment, l'aubergine, le concombre, le chou-fleur ( "Virus des solanacées," n.d.).

## **Gamme d'hôtes**

Les tobamovirus ont une gamme d'hôtes naturels qui varient en fonction des espèces virales. Les hôtes naturels du tomato mosaic virus (ToMV) se limitent principalement à la tomate et au piment/poivron, même si on peut le retrouver chez d'autres solanacées comme le tabac, le pétunia ou la morelle. A l'inverse, le tobacco mosaic virus (TMV) est un peu plus polyphage avec une quarantaine d'espèces de solanacées hôtes décrites et pouvant aussi infecter d'autres familles de plantes comme les astéracées, brassicacées ou fagacées (Marchoux et al. 2008).

## **Morphologie**

Les tobamovirus ont une morphologie allongée et rigide à symétrie hélicoïdale mesurant 300 nm de long avec un diamètre de 17 à 18 nm (Figure 10). La capsid virale est composée d'environ 2100 sous-unités formant une coque protectrice non enveloppée. Ces sous-unités sont liées par des structures secondaires en hélices  $\alpha$ , des feuillets  $\beta$  et des boucles. À l'intérieur de cette coque protéique se trouve l'acide nucléique virale (*Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus* - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLANCOURT, n.d.).

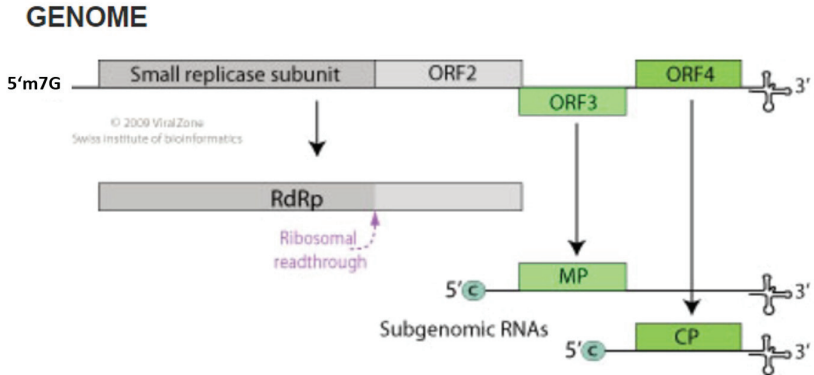


**Figure 10: Représentation de la particule virale du *tobacco mosaic virus*.**

En rouge se trouve l'ARN viral entouré par la coque protéique mesurant 300 nm de long avec un diamètre de 17 nm (d'après 'Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Ed. Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLANCOURT, n.d.).

### Organisation du génome

Le génome des tobamovirus est composé d'une molécule ARN simple brin linéaire de polarité positive d'environ 6.5 kb, dont la traduction s'effectue directement dans la cellule hôte. L'extrémité 5' est modifiée par une coiffe nucléotidique méthylée (m<sup>7</sup>G5'pppG) alors que l'extrémité 3' possède une structure de type ARNt. Le génome code pour au moins quatre protéines dont deux protéines non structurales dites de réplication comprenant une activité RNA hélicase et RNase polymérase RNA dépendante (RdRp) de 126 kDa et 183 kDa respectivement, la protéine de mouvement (MP) de 30 kDa et la protéine de capsid (CP) de 17.5 kDa (Conti et al., 2017; "Genus," n.d.) (Ishibashi and Ishikawa, 2016) (Figure 11).



**Figure 11: Génome du *tobacco mosaic virus* (TMV) représentatif des *tobamovirus***

Le TMV est un virus monopartite qui comprend un ARN génomique codant pour des réplicases (ombragées en gris : "small replicate subunit" et ORF2), une ARN hélicase et une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) de 126 kDa et 183 kDa ; la protéine de mouvement (MP) de 30 kDa et la protéine de capsid (CP) de 17,5 kDa codées par 2 "subgenomic RNA" à partir des ORF3 et ORF4 (ombragés en vert). <https://viralzone.expasy.org/51>.

La RdRp est impliquée dans le processus de répllication du virus dans la cellule hôte et intervient aussi comme suppresseur du gene silencing. Le gene silencing est un moyen de lutte contre l'infection virale développé par les plantes qui reconnait puis élimine les acides nucléiques double-brins parasites. Ce mécanisme a été également décrit chez les tobamovirus (Conti et al., 2017).

La protéine de mouvement joue un rôle essentiel dans la dissémination des particules virales au sein de la plante. Des études sur le TMV ont mis en relief différents rôles impliquant les MP, parmi lesquels la capacité d'automouvement, de se fixer à l'ARN viral et de favoriser la translocation de complexes viraux entre cellules voisines. Ces protéines de transports assurent la migration des virus sur courte distance d'une cellule infectée à une cellule adjacente à travers les plasmodesmes. Les

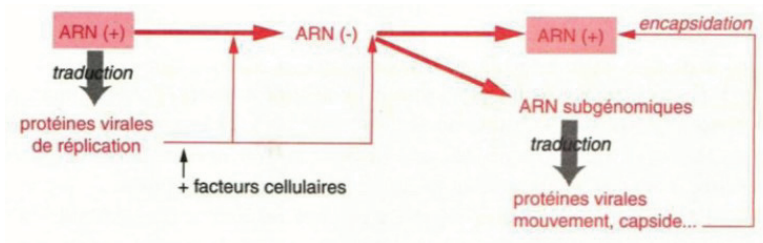


protéines de mouvement forment un large complexe de mouvement qui se fixe à la fois au réticulum endoplasmique et à l'ARN viral et diffuse à travers les plasmodesmes (Otulak and Garbaczewska, 2011; Sheshukova et al., 2020).

La CP joue un rôle dans l'assemblage et la stabilité des particules virales. La capsidase assure l'intégrité du génome pendant les transports à longue distance dans les vaisseaux conducteurs du phloème (*Principe de virologie végétale; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLANCOURT, n.d.*). Des études anciennes sur le mouvement à longue distance du TMV chez la tomate et le tabac ont révélé que le mouvement à longue distance du virus chez des mutants du TMV dépourvus de CP fonctionnelle est limité voire inexistant (Ding et al., 1996). Plus récemment en comparant une chimère du TMV possédant le gène CP d'un autre tobamovirus, l'*Ondotoglossum ringspot virus*, inoculé à des feuilles de *N. tabacum*, des auteurs ont observé que cette chimère restait limitée aux feuilles inoculées alors que le TMV non modifié pouvait se propager dans la plante entière par l'intermédiaire des vaisseaux du phloème (Hilf and Dawson, 1993).

## Réplication

Après l'entrée de la particule virale dans la cellule végétale soit par une ouverture naturelle soit après une blessure, la particule virale se désassemble libérant l'ARN génomique viral (ARNg) dans le cytoplasme de la plante hôte. La RdRp est la première à être synthétisée permettant de répliquer l'ARNg parental en brins négatifs servant à son tour de matrice pour permettre une synthèse abondante de brins d'ARNg complémentaires positifs. La MP et la CP sont synthétisées plus tardivement à partir des ARNs subgénomiques (Figure 12). (*Principe de virologie végétale; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLANCOURT, n.d.*).



**Figure 12:** Représentation de la réplique de l'ARN génomique (ARNg) des *tobamovirus*

(Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLAN COURT, n.d.).

### Stabilité et résistance

Les tobamovirus sont dotés d'une grande stabilité (i.e. capacité à survivre dans un environnement sans contrainte particulière) et d'une grande résistance (i.e. capacité à survivre dans des environnements soumis à de fortes contraintes). La nature des interactions et forces chimiques structurant la particule pourraient expliquer la stabilité des sous-unités entre elles, notamment des liaisons internes de nature hydrophobe et liaisons externes de nature électrostatique (*Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLAN COURT, n.d.*). La résistance des tobamovirus se traduit en particulier par un point d'inactivation thermique de dix minutes pendant 90°C. Si la durée de survie des tobamovirus n'est pas connue précisément, elle est estimée à plusieurs années ("*Genus,*" n.d.; Smith and Dombrovsky, 2019).

Un grand nombre de travaux décrivent l'omniprésence des tobamovirus dans des environnements très variés (Aguado-García et al., 2020) que ce soit dans les sols contaminés (Smith and Dombrovsky, 2019), les eaux usées (Kitajima et al., 2018;

Rosario et al., 2009), les océans et eaux douces (Castello et al., 1999; Kegler et al., 1994) (Castello et al., 1999; Jacobi, 1991), les glaciers et le permafrost (Castello et al., 1999), les eaux de montagnes (Jd et al., 1995), ainsi que dans les nuages et brouillards (Jd et al., 1995). Il a été démontré que les tobamovirus se maintiennent dans les fruits et légumes infectés crus ou ayant subi une transformation agroalimentaire tels que les piments en poudre (Zhang et al., 2006) ou les sauces épicées comme le tabasco (Colson et al., 2010). Kitajima et al (2018) montrent également que les tobamovirus gardent leur pouvoir infectieux dans les produits alimentaires malgré les conditions thermiques élevées utilisées pour leur transformation alimentaire et/ou leur conditionnement sous une faible teneur en eau dans le cas d'aliments à base de poudre desséchée. Les tobamovirus résistent également au processus de transformation industrielle du tabac pour la fabrication de cigarettes et de cigares, et sont retrouvés dans la salive des fumeurs ayant été en contact avec du tabac infecté (Baliq, 2013; Baliq et al., 2015a). Ainsi, le titre moyen d'ARN de TMV a été estimé à  $9.5^{10}$  copies d'ARN dans les cigarettes et  $3.8^{10}$  par ml de salive de fumeurs, y compris dans les prélèvements respiratoires de patients atteints de tabagisme avec des antécédents de pneumopathie et de cancer du poumon (Baliq, 2013; Baliq et al., 2013). Plusieurs études ont également montré que des tobamovirus pouvaient être mis évidence dans les spécimens fécaux chez l'Homme (Rosario et al., 2009; Zhang et al., 2006). C'est le cas du PMMoV dont les concentrations détectées d'ARN ont été estimées à  $10^9$  copies/gramme de poids sec (Zhang et al., 2006). La présence de PMMoV peut aussi être retrouvée dans le tractus intestinal des adultes ne présentant aucun symptômes cliniques (Zhang et al., 2006) et également, dans les selles des patients hospitalisés se plaignant de douleurs abdominales (Colson et al., 2010). Les tobamovirus sont les plus abondants des virus eucaryotiques détectés dans les selles et les écouillons oropharyngés de nouveau-nés (à partir de 2 semaines d'âge) et de jeunes enfants (âgés d'une année) (Aguado-García et al., 2020). Ces auteurs ont rapporté que dans une région semi-rurale du Mexique, les tobamovirus sont largement représentés dans le tractus intestinal et l'oropharynx des enfants en bonne santé, c'est-à-dire ne présentant

aucun symptômes respiratoire ou gastro-intestinal. L'étude a pris en compte trois enfants âgés de deux semaines jusqu'à douze mois dont les mères consommaient fréquemment des légumes tels que les poivrons verts et les tomates. Cette étude a démontré la présence précoce de tobamovirus chez les nouveau-nés ou même dans le cas de jeunes enfants exclusivement nourris au sein (avant l'introduction d'aliments solides complémentaires), dont le ToMV, le PMMoV et le tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). Ces auteurs font l'hypothèse que les tobamovirus pourraient être transmis de la mère au nouveau-né par le lait maternel ou indirectement par le contact des jeunes enfants avec d'autres supports contaminés comme les mains ou objets divers (Aguado-García et al., 2020). Chez les individus adultes, la transmission passerait par la consommation d'aliments à base de fruits contaminés (Zhang et al., 2006), les activités agricoles et même le recours à la médecine traditionnelle utilisant des produits infectés (Baliq, 2013, 2013).

La persistance des tobamovirus a également été étudiée dans des modèles expérimentaux animaux. Il a été montré que les particules de TMV pouvaient pénétrer dans les poumons de souris inoculées par voie intratrachéale et rester viables dans le tissu pulmonaire et les macrophages pulmonaires murins jusqu'à 14 jours dans des conditions expérimentales. Dans cette même étude, le TMV a également été détecté dans des cultures *in vitro* de macrophages dérivés de la moelle osseuse murine inoculé avec différentes concentrations de virus. Les auteurs ont montré que le TMV pouvait persister dans ces cellules jusqu'à 15 jours après l'inoculation (Baliq, 2013; Baliq et al., 2013).

## Symptômes

L'infection par les tobamovirus s'accompagne de symptômes qui diffèrent selon la plante infectée. Chez la tomate par exemple, les tobamovirus affectent l'architecture, l'aspect et la croissance de la plante. Les organes de la plante qui sont touchés sont

principalement les feuilles et les fruits (Marchoux et al. 2008). Les symptômes foliaires les plus caractéristiques sont la présence de mosaïques et le nombre de feuilles entre les bouquets floraux peut être réduit. La qualité des fruits se traduit par un défaut de maturité (décoloration), une taille réduite et une altération de la teneur en sucres. (“Ressources génétiques - Revues du Cirad TOBAMOVIRUS Tm2 et Tm-22 genes de resistance.pdf,” n.d.). Des nécroses sur le pédoncule, les calices et les pétioles peuvent également être observées chez la tomate infectée par certains tobamovirus. Des taches jaunes ou brunes, des déformations, des irrégularités de maturation et des rugosités sur la peau sont notamment décrites dans le cas d’infection par le ToBRFV (Luria et al., 2017; Smith and Dombrovsky, 2019; Verdin et al., 2020) Figure 13).

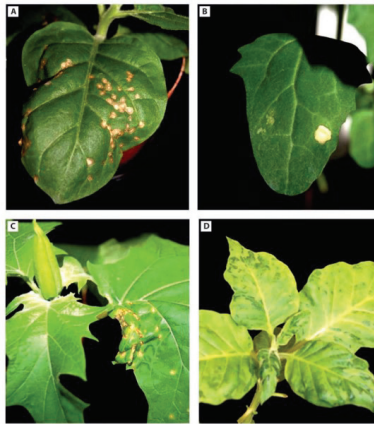


**Figure 13: Symptômes du ToBRFV chez la tomate**

Symptômes de rugosité sur fruits (a, d). Décoloration de fruits (b, c). Mosaïques foliaires et rétrécissement accompagné de la marbrure des feuilles (e-g). Symptômes nécrotiques sur le pédoncule, les calices et les pétioles (g) (Smith and Dombrovsky, 2019).

En fonction de la plante sensible inoculée, les symptômes peuvent s’exprimer uniquement au niveau du site d’inoculation (lésions locales), ou bien être généralisés à l’ensemble de la plante (lésions systémiques). Le ToMV et le TMV causent en

particulier des lésions locales observées au niveau des feuilles de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (Figure 14A) et de *Chenopodium quinoa* (Figure 14B), ou encore l'apparition des lésions nécrotiques locales sur *Datura stramonium* pour le ToMV (Figure 14C). Des mosaïques systémiques sont observées chez *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun* coinfectée par le ToMV et le TMV (Figure 15D) (Jezewska et al., 2018).



**Figure 14: Symptômes de tobamovirus (ToMV et TMV)**

Lésions locales causées par le ToMV et le TMV sur *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (A). ToMV et le TMV sur *Chenopodium quinoa* (B). Lésions nécrotiques locales causées par le ToMV sur *Datura stramonium* (C). Mosaïques systémiques chez *N tabacum* cv. *Samsun* coinfectée par le ToMV et le TMV (D) (Jezewska et al., 2018).

## Pouvoir pathogène

Différentes hypothèses permettent d'appréhender les mécanismes responsables des symptômes associés aux tobamovirus chez les plantes. L'une d'entre elles relie l'apparition des symptômes chez les plantes à la modification des processus épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN de l'hôte médiée par des petits ARN endogènes non codants d'une longueur de 24 nt. Cette modification pourrait

perturber les profils d'expression des gènes associés aux défenses antivirales et conduire à l'expression de certains symptômes caractéristiques comme la chlorose (Leone et al., 2020). Un autre mécanisme repose sur le détournement de la régulation médiée par le « gene silencing ». Ce processus est impliqué dans la défense des plantes et fait intervenir différentes protéines impliquées dans la reconnaissance d'ARN viraux et en particulier des exonucléases qui reconnaissent et découpent les ARNs double-brins viraux en petits ARNs double-brins interférents d'une taille de 21-24 nt (voir la partie « Viroïdes », paragraphe « Pathogénicité »). Les tobamovirus disposent de facteurs viraux permettant de détourner le mécanisme du « gene silencing » conduisant à réduire les mécanismes de défense naturels chez les plantes infectées (2012) (Ding et al., 2004; Vance and Vaucheret, 2001).

Des études se sont intéressées à rechercher la présence de tobamovirus chez l'Homme en lien avec d'éventuelles pathologies humaines. Bien qu'Aguado-García et al., 2020 n'aient pas pu établir ce type de corrélation chez les nouveau-nés et les jeunes enfants de moins d'un an, Colson et al. (2010) ont montré que des symptômes, tels que l'asthénie et l'hyperventilation, étaient associés à la présence d'ARNs de tobamovirus chez l'enfant de cinq ans (Aguado-García et al., 2020; Colson et al., 2010). Colson et al. (2010) ont également montré que la détection d'ARN viraux était associée à des symptômes cliniques diarrhéiques chez l'adulte tels que la fièvre, les douleurs abdominales et une sensation de démangeaison ou de prurit. Ils ont mis en évidence une réponse immunitaire médiée par les IgM et associée à la présence du PMMoV. Ils ont suggéré la possibilité d'un rôle pathogène direct ou indirect des virus de plante chez l'Homme (Colson et al., 2010), posant la question d'une possible répllication des tobamovirus chez l'humain, ou de l'existence d'hôte potentiel en dehors du monde végétal.

## Mode d'infection

Les tobamovirus se propagent selon deux modes d'infection, mode direct et mode indirect. Le mode d'infection direct se traduit par la présence du virus dans les semences, les plants destinés à la plantation, les fruits. Il va se disséminer via le transport de matériel végétal dans une zone de production, entre différents bassins de productions ou bien entre pays et continents. Le deuxième mode est une contamination indirecte qui se traduit par la présence du virus dans/sur tous supports inertes ou biologiques qui serviront de source d'inoculum par contact avec des plantes saines. Il peut s'agir des mains, des vêtements et chaussures, des systèmes d'irrigations, du sol et déchets de végétaux contaminés, du matériel utilisé lors de la manipulation des plantes en serre ou en plein champ (outils, palettes, véhicules...) (Smith and Dombrovsky, 2019; Verdin et al., 2020). De même, la contamination via les insectes pollinisateurs, les oiseaux et enfin par les adventices et plantes sauvages peuvent aussi constituer des sources d'infection et dissémination des tobamovirus vers des plantes cultivées.

La transmission des virus aux plantules à partir de semences contaminées est la cause majeure de la dissémination des tobamovirus sur de longues distances. C'est ce qui explique notamment la dissémination à l'échelle mondiale du tomato brown rugose fruit virus, un tobamovirus émergent infectant principalement les tomates (*Solanum lycopersicum*), les piments et les poivrons (*Capsicum annuum*). Le ToBRFV a fait l'objet d'alertes depuis sa première description en 2014 au Moyen-Orient (Israël et Jordanie) et sur le continent américain (Mexique 2018 et Etats-Unis 2019). Depuis 2018, ce virus s'est propagé dans plusieurs pays d'Europe : Allemagne, Italie, Royaume-Uni, Pays-Bas, la Grèce et l'Espagne. Il a été signalé en France (février 2020) dans une serre de production en Bretagne. Le ToBRFV est réglementé dans l'Union Européenne depuis novembre 2019 et a été ajouté à la liste d'alerte de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP).



## Stratégies de management

### 1. La Prophylaxie

Pour limiter l'introduction des tobamovirus dans une nouvelle zone de production, les lots de semences doivent provenir préférentiellement de zones indemnes. Dans les cultures, des mesures sanitaires de prophylaxie particulièrement strictes doivent être utilisées pour lutter contre ces virus transmis par simple contact comme l'utilisation des vêtements à usage unique (blouses, sur-chaussure, gants...), la désinfection fréquente des outils de travail ("ToBRFV-QA.pdf," n.d.) "protocole\_virus\_contact\_tomate\_2019\_Chambre d'agriculture\_APREL\_v3.pdf," n.d.; Verdin et al., 2020).

### 2. Méthodes de lutte

Des stratégies de gestion, destinées à lutter contre les tobamovirus, ont été mises en place afin de réduire leurs effets néfastes dans les cultures en cas d'infection.

Les plantes suspectes doivent être isolées puis détruites si la contamination y est avérée. Un vide sanitaire avec désinfection complète des structures et de tout matériel en contact avec les plantes doit être effectué. Les lots de semences provenant de zones contaminées doivent être désinfectés en employant des protocoles adaptés, tels que le trempage dans l'eau de Javel (hypochlorite de sodium), ou le phosphate trisodique, et des traitements thermiques à la chaleur sèche. ("n° 2020-SA-0038 Demande d'appui scientifique et technique sur les questions relatives aux mesures de prophylax.pdf," n.d.).

Dans le cas de la tomate de consommation, la stratégie de lutte la plus efficace est l'utilisation d'hybrides résistants au ToMV et au TMV porteurs des gènes de résistances *Tm-2* et *Tm-22* offrant aux tomates un niveau de résistances très élevé. Cependant ces hybrides, déployés durablement dans les cultures depuis plus d'une trentaine d'année, sont aujourd'hui sensibles au ToBRFV, ce qui conduit les entreprises semencières à relancer des programmes de sélection pour produire des

variétés de tomates résistantes au ToBRFV ("Évaluation du risque simplifiée du ToBRFV pour la France métropolitaine .pdf," n.d.).

## Références

- AbouHaidar, M.G., Venkataraman, S., Golshani, A., Liu, B., Ahmad, T., 2014. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14542–14547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402814111>
- Adkar-Purushothama, C.R., Iyer, P.S., Perreault, J.-P., 2017. Potato spindle tuber viroid infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like and Ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Sci. Rep.* 7, 8341. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08823-z>
- Aguado-García, Y., Taboada, B., Morán, P., Rivera-Gutiérrez, X., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximénez, C., Arias, C.F., 2020. Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx and gut of infants during their first year of life. *Sci. Rep.* 10, 13595. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>
- ANSES/LSV/MA034 - Version 2, n.d. 20.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis.* 91, 47–50.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Gofman, R., Bar-Joseph, M., 2002. A new disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain of Tomato apical stunt viroid (TASVd). *Phytoparasitica* 30, 502–510.
- Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., Vielle-Calzada, J.-P., 2006. A Family of MicroRNAs Present in Plants and Animals. *Plant Cell* 18, 3355–3369. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044420>
- Astbury, S., Costa Nunes Soares, M.M., Peprah, E., King, B., Jardim, A.C.G., Shimizu, J.F., Jalal, P., Saeed, C.H., Sabeer, F.T., Irving, W.L., Tarr, A.W., McClure, C.P., 2020. Nanopore sequencing from extraction-free direct PCR of dried serum spots for portable hepatitis B virus drug-resistance typing. *J. Clin. Virol. Off.*

- Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 129, 104483.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104483>
- Balique, F., 2013. Détection et impact potentiel des tobamovirus chez l'homme 212.
- Balique, F., Colson, P., Barry, A.O., Nappes, C., Ferretti, A., Moussawi, K.A., Ngounga, T., Lepidi, H., Ghigo, E., Mege, J.-L., Lecoq, H., Raoult, D., 2013. Tobacco Mosaic Virus in the Lungs of Mice following Intra-Tracheal Inoculation. *PLOS ONE* 8, e54993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054993>
- Balique, F., Colson, P., Raoult, D., 2012. Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers. *J. Clin. Virol.* 55, 374–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.012>
- Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., Colson, P., 2015a. Can Plant Viruses Cross the Kingdom Border and Be Pathogenic to Humans? *Viruses* 7, 2074–2098. <https://doi.org/10.3390/v7042074>
- Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., Colson, P., 2015b. Can Plant Viruses Cross the Kingdom Border and Be Pathogenic to Humans? *Viruses* 7, 2074–2098. <https://doi.org/10.3390/v7042074>
- Beijerinck, n.d. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter 24.
- Bengone-Abogourin, J.G., Chelkha, N., Verdin, E., Colson, P., 2020. Sequence Similarities between Viroids and Human MicroRNAs. *Intervirology* 1–8. <https://doi.org/10.1159/000509212>
- Botelho-Souza, L.F., Vasconcelos, M.P.A., dos Santos, A. de O., Salcedo, J.M.V., Vieira, D.S., 2017. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol. J.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0845-y>
- Brass, J.R.J., Owens, R.A., Matoušek, J., Steger, G., 2017. Viroid quasispecies revealed by deep sequencing. *RNA Biol.* 14, 317–325. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272745>
- Brazas, R., Ganem, D., 1996. A Cellular Homolog of Hepatitis Delta Antigen: Implications for Viral Replication and Evolution. *Science* 274, 90–94. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.90>

- Brett J. Baker, Luis R. Comolli, Gregory J. Dick, Loren J. Hauser, Doug Hyatt, Brian D. Dill, Miriam L. Land, Nathan C. VerBerkmoes, Robert L. Hettich, Jillian F. Banfield, 2010. Enigmatic, ultras-small, uncultivated Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Apr 2010, 200914470; DOI: 10.1073/pnas.0914470107
- Brown, C., Hug, L., Thomas, B. et al., 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523, 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature14486>
- Bussièrè, F., Lafontaine, D., Côté, F., Beaudry, D., Perreault, J.P., 1995. Evidence for a model ancestral viroid. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 143–144.
- Candresse, T., Marais, A., Ollivier, F., Verdin, E., Blancard, D., 2007a. First Report of the Presence of *Tomato apical stunt viroid* on Tomato in Sénégal. *Plant Dis.* 91, 330–330. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0330C>
- Candresse, T., Marais, A., Ollivier, F., Verdin, E., Blancard, D., 2007b. First Report of the Presence of *Tomato apical stunt viroid* on Tomato in Sénégal. *Plant Dis.* 91, 330–330. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0330C>
- Castello, J.D., Rogers, S.O., Starmer, W.T., Catranis, C.M., Ma, L., Bachand, G.D., Zhao, Y., Smith, J.E., 1999. Original Paper.
- Chang, W.-S., Pettersson, J.H.-O., Le Lay, C., Shi, M., Lo, N., Wille, M., Eden, J.-S., Holmes, E.C., 2019. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* 5. <https://doi.org/10.1093/ve/vez021>
- Chitwood, D.H., Timmermans, M.C., 2010. Small RNAs are on the move. *Nature* 467, 415.
- Colson, P., Borentain, P., Ravaux, I., Aherfi, S., 2020a. Hepatitis B Virus Genomics Knocking at the Door of Routine Diagnostic Laboratories. *J. Infect. Dis.* 221, 1026–1029. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz544>
- Colson, P., Lagier, J.-C., Baudoin, J.-P., Bou Khalil, J., La Scola, B., Raoult, D., 2020b. Ultrarapid diagnosis, microscope imaging, genome sequencing, and culture

- isolation of SARS-CoV-2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 39, 1601–1603. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03869-w>
- Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.-J., Berbis, P., Lecoq, H., Harlé, J.-R., Berland, Y., Raoult, D., 2010. Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. *PLOS ONE* 5, e10041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010041>
- Conti, G., Rodriguez, M.C., Venturuzzi, A.L., Asurmendi, S., 2017. Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins. *Ann. Bot.* 119, 737–747. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw216>
- Cottilli, P., Belda-Palazón, B., Adkar-Purushothama, C.R., Perreault, J.-P., Schleiff, E., Rodrigo, I., Ferrando, A., Lisón, P., 2019. Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Res.* gkz679. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz679>
- Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10, nrg2634. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>
- Dadami, E., Dalakouras, A., Wassenegger, M., 2017. Viroids and RNA Silencing, in: *Viroids and Satellites*. Elsevier, pp. 115–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00011-5>
- Dalakouras, A., Dadami, E., Wassenegger, M., 2013. Viroid-induced DNA methylation in plants. *Biomol. Concepts* 4, 557–565. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0030>
- Dall, D., Penrose, L., Daly, A., Constable, F., Gibbs, M., 2019. Prevalences of Pospiviroid Contamination in Large Seed Lots of Tomato and Capsicum, and Related Seed Testing Considerations. *Viruses* 11, 1034. <https://doi.org/10.3390/v11111034>
- Daròs, J.-A., Aragónés, V., Cordero, T., 2018a. A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>

- Daròs, J.-A., Aragonés, V., Cordero, T., 2018b. A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8, 1904. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- Daròs, J.-A., Flores, R., 2004. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6792–6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401090101>
- de Bernardis, E., Busà, L., 2020. A putative role for the tobacco mosaic virus in smokers' resistance to COVID-19. *Med. Hypotheses* 143, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110153>
- de la Peña, M., García-Robles, I., 2010a. Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.* 11, 711–716. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.100>
- de la Peña, M., García-Robles, I., 2010b. Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA N. Y. N* 16, 1943–1950. <https://doi.org/10.1261/rna.2130310>
- Delan-Forino, C., Maurel, M.-C., Torchet, C., 2011. Replication of Avocado Sunblotch Viroid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 85, 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-10>
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.Th.J., Li, S.-F., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Vidalakis, G., Owens, R.A., 2014. Current status of viroid taxonomy. *Arch. Virol.* 159, 3467–3478. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R.A., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Verhoeven, J.T.J., Vidalakis, G., Flores, R., Ictv Report Consortium, null, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Avsunviroidae. *J. Gen. Virol.* 99, 611–612. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>
- Di Serio, F., Li, S.-F., Pallás, V., Owens, R.A., Randles, J.W., Sano, T., Verhoeven, J.Th.J., Vidalakis, G., Flores, R., 2017. Viroid Taxonomy, in: *Viroids and Satellites*. Elsevier, pp. 135–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00013-9>

- Diener, T., 2016. Viroids: “living fossils” of primordial RNAs? *Biol. Direct* 11. <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0116-7>
- Diener, T.O., 2018. Of Viroids and Prions. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10120663>
- Diener, T.O., 2016. On the Existence of Animal Viroids. *Viol. Antivir. Res.* 2016. <https://doi.org/10.4172/2324-8955.1000163>
- Diener, T.O., 2003. Discovering viroids — a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 75–80. <https://doi.org/10.1038/nrmicro736>
- Diener, T.O., 1999. Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol. Suppl.* 15, 203–220. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6425-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6425-9_15)
- Diener, T.O., 1993. Hepatitis delta virus-like agents: an overview. *Prog. Clin. Biol. Res.* 382, 109–115.
- Diener, T.O., 1989. Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9370–9374.
- Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45, 411–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)
- Diener TO. On the existence of animal viroids. 5 ed. 2020. *Journal of Virology & Antiviral Research* 5;4:1-3. doi:10.417, n.d.
- Diener, T.O., Owens, R.A., 1980. Viroids, in: Hahn, F.E., Kersten, H., Kersten, W., Szybalski, W. (Eds.), *Progress In Molecular and Subcellular Biology, Progress In Molecular and Subcellular Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 235–252. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-67701-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67701-4_5)
- Diener, T.O., Raymer, W.B., 1967. Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with Properties of a Free Nucleic Acid. *Science* 158, 378–381. <https://doi.org/10.1126/science.158.3799.378>
- Ding, B., Itaya, A., 2007. Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 20, 7–20. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007>



- Ding, X., Shintaku, M.H., Carter, S.A., Nelson, R.S., 1996. Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11155–11160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11155>
- Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.-H., Folimonov, A., Hou, Y.-M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A., Nelson, R.S., 2004. The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 17, 583–592. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.583>
- Dubé, A., Bisailon, M., Perreault, J.-P., 2009. Identification of proteins from prunus persica that interact with peach latent mosaic viroid. *J. Virol.* 83, 12057–12067. <https://doi.org/10.1128/JVI.01151-09>
- Eiras, M., Nohales, M.A., Kitajima, E.W., Flores, R., Daròs, J.A., 2011. Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind in vitro specifically Potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* 156, 529–533. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0867-x>
- Elena, S.F., DoPAZO, J., FLORESt, R., Moya, S., 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis 6 virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 4.
- Epstein, L.M., Gall, J.G., 1987. Transcripts of Newt Satellite DNA Self-cleave In Vitro. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 261–265. <https://doi.org/10.1101/SQB.1987.052.01.031>
- Évaluation du risque simplifiée du ToBRFV pour le FRANCE METROPOLOITAINE .pdf, n.d.
- Feldstein, P.A., Hu, Y., Owens, R.A., 1998. Precisely full length, circularizable, complementary RNA: An infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6560–6565. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6560>

- Ferbeyre, G., Smith, J.M., Cedergren, R., 1998. Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3880–3888. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.7.3880>
- Flores, R., 2001a. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie* 324, 943–952.
- Flores, R., 2001b. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie* 324, 943–952. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01370-1](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01370-1)
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.-E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., De la Peña, M., 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett.* 567, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.118>
- Flores, R., Gago-Zachert, S., Serra, P., Sanjuán, R., Elena, S.F., 2014. Viroids: Survivors from the RNA World? *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 395–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103416>
- Flores, R., Grubb, D., Elleuch, A., Nohales, M.-Á., Delgado, S., Gago, S., 2011. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: Variations on a theme. *RNA Biol.* 8, 200–206. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14238>
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.-A., Di Serio, F., 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Flores, R., Ruiz-Ruiz, S., Serra, P., 2012a. Viroids and Hepatitis Delta Virus. *Semin. Liver Dis.* 32, 201–210. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323624>
- Flores, R., Serra, P., Minoia, S., Di Serio, F., Navarro, B., 2012b. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front. Microbiol.* 3, 217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00217>

- Fox, A., Mumford, R.A., 2017. Plant viruses and viroids in the United Kingdom: An analysis of first detections and novel discoveries from 1980 to 2014. *Virus Res.* 241, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.029>
- Fraile, A., García-Arenal, F., 2018. Tobamoviruses as Models for the Study of Virus Evolution. *Adv. Virus Res.* 102, 89–117. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.006>
- François, S., Filloux, D., Fernandez, E., Ogliastro, M., Roumagnac, P., 2018. Viral Metagenomics Approaches for High-Resolution Screening of Multiplexed Arthropod and Plant Viral Communities, in: Pantaleo, V., Chiumenti, M. (Eds.), *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 77–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_7)
- Friday, D.R., 2017. Processing of Potato Spindle Tuber Viroids (PSTVd) RNAs in Yeast, a Nonconventional Host (Ph.D.). University of the Sciences in Philadelphia, United States -- Pennsylvania.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gas, M.-E., Hernández, C., Flores, R., Daròs, J.-A., 2007. Processing of Nuclear Viroids In Vivo: An Interplay between RNA Conformations. *PLOS Pathog.* 3, e182. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030182>
- Genus: Tobamovirus - Virgaviridae - Positive-sense RNA Viruses [WWW Document], n.d. . *Int. Comm. Taxon. Viruses ICTV*. URL [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus) (accessed 11.11.20).
- Gibbs, A., Armstrong, J., Mackenzie, A.M., Weiller, G.F., 1998. The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridisation-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *J. Virol. Methods* 74, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00070-6)

- Gilbert, W., 1986. Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.
- Glouzon, J.-P., 2013. Étude de la dynamique des populations du viroïde de la mosaïque latente du pêcher par séquençage à haut débit et segmentation.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sängner, H.L., 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273, 203–208. <https://doi.org/10.1038/273203a0>
- Gupta, A., Swati, D., 2017. Hammerhead Ribozymes in Archaeal Genomes: A Computational Hunt. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 9, 192–204. <https://doi.org/10.1007/s12539-016-0141-3>
- Hadidi, A., 2019. Next-Generation Sequencing and CRISPR/Cas13 Editing in Viroid Research and Molecular Diagnostics. *Viruses* 11, 120. <https://doi.org/10.3390/v11020120>
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., Barba, M., 2016. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front. Microbiol.* 7, 1325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>
- Hamamoto, H., Watanabe, Y., Kamada, H., Okada, Y., 1997. Amino acid changes in the putative replicase of tomato mosaic tobamovirus that overcome resistance in Tm-1 tomato. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 2), 461–4. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-461>
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671–4679. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf464>
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286, 950–952. <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- Hammann, C., Steger, G., 2012. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.* 9, 809–819.

- Hammond, R.W., Owens, R.A., 2006. Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. APSnet Feature Artic. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., 2013. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7413–7418. <https://doi.org/10.1128/AEM.02354-13>
- Hetzl, U., Szivovics, L., Smura, T., Prähauser, B., Vapalahti, O., Kipar, A., Hepojoki, J., 2019. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00014-19>
- Hilf, M.E., Dawson, W.O., 1993. The Tobamovirus Capsid Protein Functions as a Host-Specific Determinant of Long-Distance Movement. *Virology* 193, 106–114. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1107>
- Hill, J.M., Zhao, Y., Bhattacharjee, S., Lukiw, W.J., 2014. miRNAs and viroids utilize common strategies in genetic signal transfer. *Front. Mol. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00010>
- Ishibashi, K., Ishikawa, M., 2016. Replication of Tobamovirus RNA. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 55–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100217>
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S., Ding, B., 2007. A Structured Viroid RNA Serves as a Substrate for Dicer-Like Cleavage To Produce Biologically Active Small RNAs but Is Resistant to RNA-Induced Silencing Complex-Mediated Degradation. *J. Virol.* 81, 2980–2994. <https://doi.org/10.1128/JVI.02339-06>
- Ivanovsky, D., 1892. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St Petersburg Acad Imp Sci Bul* 35:60, 7.

- Jacobi, V., 1991. Isolation of Tomato Mosaic Virus from Waters Draining Forest Stands in New York State. *Phytopathology* 81, 1112. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1112>
- Jd, C., Dk, L., Sm, T., So, R., Gd, B., R, J., J, C., Y, L., 1995. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology* 85, 1409–1412. <https://doi.org/10.1094/phyto-85-1409>
- Jezewska, M., Trzmiel, K., Zarzynska-Nowak, A., 2018. Detection of infectious tobamoviruses in irrigation and drainage canals in Greater Poland. *J. Plant Prot. Res.* 58. <https://doi.org/10.24425/119126>
- Jiang, D., Wang, M., Li, S., 2017. Functional analysis of a viroid RNA motif mediating cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 98, 121–125. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000630>
- Jiang, J., Zhang, Z., Hu, B., Hu, G., Wang, H., Faure, C., Marais, A., Candresse, T., Li, S., 2017. Identification of a viroid-like RNA in a lychee Transcriptome Shotgun Assembly. *Virus Res.* 240, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.012>
- Jiang, L., Wei, C., Li, Y., 2012. Viral suppression of RNA silencing. *Sci. China Life Sci.* 55, 109–118. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4279-x>
- Jiao, J., Kong, K., Han, J., Song, S., Bai, T., Song, C., Wang, M., Yan, Z., Zhang, H., Zhang, R., Feng, J., Zheng, X., n.d. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnol. J.* n/a. <https://doi.org/10.1111/pbi.13474>
- Jimenez, R.M., Delwart, E., Lupták, A., 2011. Structure-based search reveals hammerhead ribozymes in the human microbiome. *J. Biol. Chem.* 286, 7737–7743. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.209288>
- Kegler, H., Fuchs, E., Knapp, H.D., Ehrig, F., 1994. Untersuchungen zum vorkommen pflanzenpathogener viren im naturschutzgebiet insel vilm (Biosphärenreservat südost-rügen). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 29, 211–216. <https://doi.org/10.1080/03235409409383114>

- Kim, J.-S., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., Kim, S.-Y., Ryu, C.-M., 2020. Crossing the kingdom border: Human diseases caused by plant pathogens. *Environ. Microbiol.* 22, 2485–2495. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15028>
- Kitajima, M., Sassi, H.P., Torrey, J.R., 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *Npj Clean Water* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2013. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr. Opin. Virol.* 3, 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.008>
- Kovalskaya, N., Hammond, R.W., 2014. Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Sci., Disease resistance: molecular mechanisms and biotechnological applications* 228, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>
- Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y., Watanabe, Y., 2007. Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J. Gen. Virol.* 88, 2347–2352. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82994-0>
- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., Leung, S.W.S., 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 4, e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>
- L'Anses lance l'alerte : quel est ce nouveau virus repéré en Bretagne et qui menace nos tomates ? [WWW Document], n.d. . LCI. URL <https://www.lci.fr/planete/l-anses-lance-l-alerte-quel-est-ce-nouveau-virus-tobrfv-repere-en-bretagne-et-qui-menace-nos-tomates-2144566.html> (accessed 9.26.20).
- Lasda, E., Parker, R., 2014. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* 20, 1829–1842. <https://doi.org/10.1261/rna.047126.114>
- Latifi, A., Bernard, C., 2016. Replication of Avocado Sunblotch Viroid in the Cyanobacterium *Nostoc* Sp. PCC 7120. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000341>
- Le mildiou de la pomme de terre - Maladies pomme de terre [WWW Document], n.d. URL

- [https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme\\_de\\_terre/maladies\\_de\\_la\\_pomme\\_de\\_terre/mildiou\\_pomme\\_de\\_terre.html](https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme_de_terre/maladies_de_la_pomme_de_terre/mildiou_pomme_de_terre.html) (accessed 9.26.20).
- Leone, M., Zavallo, D., Venturuzzi, A., Asurmendi, S., 2020. RdDM pathway is required for Tobamovirus-induced symptomatology production. *bioRxiv* 2020.01.21.912923. <https://doi.org/10.1101/2020.01.21.912923>
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B., 2003. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 787–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- Li, R., Gao, S., Hernandez, A.G., Wechter, W.P., Fei, Z., Ling, K.-S., 2012. Deep Sequencing of Small RNAs in Tomato for Virus and Viroid Identification and Strain Differentiation. *PLoS ONE* 7, e37127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037127>
- Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., Li, F., 2018. Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *J. Virol. Methods* 259, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012>
- Lisón, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., Bellés, J.M., Conejero, V., Rodrigo, I., 2013. A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *PROTEOMICS* 13, 833–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200286>
- La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D. A giant virus in amoebae.,2003; *Science*. 2003 Mar 28;299(5615):2033. doi: 10.1126/science.1081867. PMID: 12663918. doi: 10.1126/science.1081867
- Liu, R., Vaishnav, R.A., Roberts, A.M., Friedland, R.P., 2013. Humans Have Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. *PLOS ONE* 8, e60621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060621>



- López-Carrasco, A., Ballesteros, C., Sentandreu, V., Delgado, S., Gago-Zachert, S., Flores, R., Sanjuán, R., 2017. Different rates of spontaneous mutation of chloroplastic and nuclear viroids as determined by high-fidelity ultra-deep sequencing. *PLOS Pathog.* 13, e1006547. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006547>
- López-Carrasco, A., Flores, R., 2017. Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid *in vivo*: A “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed *in vitro*. *RNA Biol.* 14, 1046–1054. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1223005>
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., Dombrovsky, A., 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLOS ONE* 12, e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Lwoff, A., 1957. The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* 17, 239–253. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-239>
- Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R.A., Sano, T., 2007. Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.* 88, 3452–3457. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83228-0>
- Mackie, A.E., Barbetti, M.J., Rodoni, B., McKirdy, S.J., Jones, R.A.C., 2019. Effects of a Potato Spindle Tuber Viroid Tomato Strain on the Symptoms, Biomass, and Yields of Classical Indicator and Currently Grown Potato and Tomato Cultivars. *Plant Dis.* 103, 3009–3017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0312-RE>
- Magnius, L., Taylor, J., Mason, W.S., Sureau, C., Dény, P., Norder, H., ICTV Report Consortium, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus. *J. Gen. Virol.* 99, 1565–1566. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001150>

- Mak, J., 2005. RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity. *Retrovirology* 2, 35. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-35>
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W., Semancik, J.S., 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149, 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0215-5>
- Marn, M.V., Pleško, I.M., 2012. First report of tomato apical stunt viroid in *Solanum jasminoides* in Slovenia. *New Dis. Rep.* 26.
- Martick, M., Horan, L.H., Noller, H.F., Scott, W.G., 2008. A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature* 454, 899–902. <https://doi.org/10.1038/nature07117>
- Martin, R., Arenas, C., Daròs, J.-A., Covarrubias, A., Reyes, J.L., Chua, N.-H., 2007. Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVD) in infected tomato plants. *Virology* 367, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.011>
- Martin, W.H., 1922. "Spindle tuber", a new potato trouble. *Spindle Tuber New Potato Trouble* 3.
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C., 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 13094–13096. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13094-13096.2002>
- Martinez, G., Castellano, M., Tortosa, M., Pallas, V., Gomez, G., 2014. A pathogenic non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Res.* 42, 1553–1562. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt968>
- McNaughton, A.L., Roberts, H.E., Bonsall, D., de Cesare, M., Mokaya, J., Lumley, S.F., Golubchik, T., Piazza, P., Martin, J.B., de Lara, C., Brown, A., Ansari, M.A., Bowden, R., Barnes, E., Matthews, P.C., 2019. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Sci. Rep.* 9, 7081. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43524-9>

- Messmer, A., Sanderson, D., Braun, G., Serra, P., Flores, R., James, D., 2017. Molecular and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like RNA from 'Pacific Gala' apple (*Malus domestica*) in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 39, 342–353. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1354334>
- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J.C., Navarro, B., Flores, R., 2014. Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J. Virol.* 88, 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-14>
- Mitchell, S.L., Simner, P.J., 2019. Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology: Are We There Yet? *Clin. Lab. Med.* 39, 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.05.003>
- Moelling, K., Broecker, F., 2019. Viruses and Evolution - Viruses First? A Personal Perspective. *Front. Microbiol.* 10, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00523>
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, É., Lacomme, C., Burgyán, J., 2005. Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812–7818. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7812-7818.2005>
- Moon, J., Jang, Y., Kim, N., Park, W.B., Park, K.-I., Lee, S.-T., Jung, K.-H., Kim, M., Lee, S.K., Chu, K., 2018. Diagnosis of Haemophilus influenzae Pneumonia by Nanopore 16S Amplicon Sequencing of Sputum. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1944–1946. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180234>
- Moreno, M., Vázquez, L., López-Carrasco, A., Martín-Gago, J.A., Flores, R., Briones, C., 2019. Direct visualization of the native structure of viroid RNAs at single-molecule resolution by atomic force microscopy. *RNA Biol.* 1–14. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572436>
- n° 2020-SA-0038 Demande d'appui scientifique et technique sur les questions relatives aux mesures de prophylax.pdf, n.d.
- Navarro, B., Di Serio, F., 2018. Double-Stranded RNA-Enriched Preparations to Identify Viroids by Next-Generation Sequencing, in: Pantaleo, V., Chiumenti,

- M. (Eds.), *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 37–43.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_3)
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.-E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F., 2012. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94, 1474–1480.
- Olson, P., Lu, J., Zhang, H., Shai, A., Chun, M.G., Wang, Y., Libutti, S.K., Nakakura, E.K., Golub, T.R., Hanahan, D., 2009. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer. *Genes Dev.* 23, 2152–2165. <https://doi.org/10.1101/gad.1820109>
- Osborne, E.M., Schaak, J.E., Derose, V.J., 2005. Characterization of a native hammerhead ribozyme derived from schistosomes. *RNA N. Y. N* 11, 187–196.  
<https://doi.org/10.1261/rna.7950605>
- Otulak, K., Garbaczewska, G., 2011. Cell-to-cell movement of three genera (+) ss RNA plant viruses. *Acta Physiol. Plant.* 33, 249–260. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0538-2>
- Owens, R.A., Hammond, R.W., 2009. Viroid Pathogenicity: One Process, Many Faces. *Viruses* 1, 298–316. <https://doi.org/10.3390/v1020298>
- Panno, S., Caruso, A.G., Davino, S., 2019. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Dis.* 103, 1443–1443.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Paraskevopoulou, S., Pirzer, F., Goldmann, N., Schmid, J., Corman, V.M., Gottula, L.T., Schroeder, S., Rasche, A., Muth, D., Drexler, J.F., Heni, A.C., Eibner, G.J., Page, R.A., Jones, T.C., Müller, M.A., Sommer, S., Glebe, D., Drosten, C., 2020. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnikar, M., 2017. Next Generation Sequencing for Detection and Discovery

- of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Petit, P.R., Borentain, P., Aherfi, S., Gérolami, R., Colson, P., 2020. Hepatitis Delta recurrence post-liver transplantation in absence of detectable hepatitis B surface antigen and hepatitis B virus DNA in peripheral blood. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 44, e41–e44. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.11.007>
- Piernikarczyk, R.J.J., 2016. Viroid evolution and viroid-induced pathogenesis networks in host plants. *Universitäts-und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les choses BOULOGNE BILLAN COURT, n.d.
- protocole\_virus\_contact\_tomate\_2019\_Chambre d'agriculture\_APREL\_v3.pdf, n.d.
- Quick, J., Grubaugh, N.D., Pullan, S.T., Claro, I.M., Smith, A.D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T.F., Beutler, N.A., Burton, D.R., Lewis-Ximenez, L.L., de Jesus, J.G., Giovanetti, M., Hill, S.C., Black, A., Bedford, T., Carroll, M.W., Nunes, M., Alcantara, L.C., Sabino, E.C., Baylis, S.A., Faria, N.R., Loose, M., Simpson, J.T., Pybus, O.G., Andersen, K.G., Loman, N.J., 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* 12, 1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>
- Raoult D, La Scola B, Birtles R., 2007. The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2007 Jul;45(1):95-102. DOI: 10.1086/518608.
- Raoult, D., Forterre, P., 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 315. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1858>
- Raoult,D.,2010. Technology-driven research will dominate hypothesis-driven research: the future of microbiology. *Future Microbiology* vol. 5, no. 2special

- focus issue: on the road to systems biology of host-pathogen interactions - editorial Free Access. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.119>
- Ressources génétiques - Revues du Cirad TOBAMOVIRUS Tm2 et Tm-22 genes de resistance.pdf, n.d.
- Riccitelli, N.J., Delwart, E., Lupták, A., 2014. Identification of minimal HDV-like ribozymes with unique divalent metal ion dependence in the human microbiome. *Biochemistry* 53, 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/bi401717w>
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Aricò, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., Verme, G., 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18, 997–1003. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>
- Rizzetto, M., Stroffolini, T., 2021. Forty-Five Years after the Discovery of the Hepatitis D Virus: Where Do We Stand? *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13040555>
- Robertson, H.D., 1996. How Did Replicating and Coding RNAs First Get Together? *Science* 274, 66–67. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.66>
- Roger, R., 2011. Les viroïdes. *frontierebiologie*. URL <https://frontierebiologie.wordpress.com/article/les-viroides-3vj6j5b5omxnq-2/> (accessed 9.26.20).
- Rojas, A.A., Vazquez-Tello, A., Ferbeyre, G., Venanzetti, F., Bachmann, L., Paquin, B., Sbordoni, V., Cedergren, R., 2000. Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res.* 28, 4037–4043. <https://doi.org/10.1093/nar/28.20.4037>
- Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J., Breitbart, M., 2009. Pepper Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7261–7267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00410-09>
- Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A., Szostak, J.W., 2006. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 313, 1788–1792. <https://doi.org/10.1126/science.1129308>

- Sanger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., Kleinschmidt, A.K., 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 3852–3856. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3852>
- Seehafer, C., Kalweit, A., Steger, G., Gräf, S., Hammann, C., 2011. From alpaca to zebrafish: Hammerhead ribozymes wherever you look. RNA 17, 21–26. <https://doi.org/10.1261/rna.2429911>
- Seligmann, H., Raoult, D., 2018. Stem-Loop RNA Hairpins in Giant Viruses: Invading rRNA-Like Repeats and a Template Free RNA. Front. Microbiol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00101>
- Seligmann, H., Raoult, D., 2016. Unifying view of stem-loop hairpin RNA as origin of current and ancient parasitic and non-parasitic RNAs, including in giant viruses. Curr. Opin. Microbiol., Environmental microbiology \* Special Section: Megaviromes 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.004>
- Sheshukova, E., Ershova, N., Kamarova, K., Dorokhov, Y., Komarova, T., 2020. The Tobamoviral Movement Protein: A “Conditioner” to Create a Favorable Environment for Intercellular Spread of Infection. Front. Plant Sci. 11, 959. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00959>
- Sidharthan, V.K., Sevanthi, A.M., Jaiswal, S., Baranwal, V.K., 2020. Robust Virome Profiling and Whole Genome Reconstruction of Viruses and Viroids Enabled by Use of Available mRNA and sRNA-Seq Datasets in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). Front. Microbiol. 11, 1232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01232>
- Smith, E., Dombrovsky, A., 2019. Aspects in *Tobamovirus* Management in Intensive Agriculture. Plant Dis.-Curr. Threats Manag. Trends. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87101>
- Smith, R.L., Lawrence, J., Shukla, M., Singh, M., Li, X., Xu, H., Gardner, K., Nie, X., 2018. First Report of *Coleus blumei* viroid 5 and Molecular Confirmation of *Coleus blumei* viroid 1 in Commercial *Coleus blumei* in Canada. Plant Dis. 102, 1862–1862. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0055-PDN>

- Sogo, J.M., Koller, Th., Diener, T.O., 1973. Potato spindle tuber viroid: X. visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* 55, 70–80. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(73\)81009-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(73)81009-8)
- St-Pierre, P., Hassen, I.F., Thompson, D., Perreault, J.P., 2009. Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.008>
- Symons, R.H., Randles, J.W., 1999. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 239, 81–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-09796-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-09796-0_5)
- Szirovicza, L., Hetzel, U., Kipar, A., Martinez-Sobrido, L., Vapalahti, O., Hepojoki, J., 2020. Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles. *mBio* 11, e03250-19, /mbio/11/2/mBio.03250-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.03250-19>
- Tangkanchanapas, P., Haegeman, A., Ruttink, T., Höfte, M., De Jonghe, K., 2020. Whole-Genome Deep Sequencing Reveals Host-Driven in-planta Evolution of Columnea Latent Viroid (CLVd) Quasi-Species Populations. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21093262>
- Taylor, J., Pelchat, M., 2010. Origin of hepatitis  $\delta$  virus. *Future Microbiol.* 5, 393–402. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.15>
- te Velthuis, A.J.W., Long, J.C., Bauer, D.L.V., Fan, R.L.Y., Yen, H.-L., Sharps, J., Siegers, J.Y., Killip, M.J., French, H., Oliva-Martín, M.J., Randall, R.E., de Wit, E., van Riel, D., Poon, L.L.M., Fodor, E., 2018. Mini viral RNAs act as innate immune agonists during influenza virus infection. *Nat. Microbiol.* 3, 1234–1242. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0240-5>
- Teixeira, A., Tahiri-Alaoui, A., West, S., Thomas, B., Ramadass, A., Martjanov, I., Dye, M., James, W., Proudfoot, N.J., Akoulitchev, A., 2004. Autocatalytic RNA cleavage in the human beta-globin pre-mRNA promotes transcription termination. *Nature* 432, 526–530. <https://doi.org/10.1038/nature03032>



- The Ribosome Is a Ribozyme | Science [WWW Document], n.d. URL <https://science.sciencemag.org/content/289/5481/878.full> (accessed 5.2.21). ToBRFV-QA.pdf, n.d.
- Tseng, C.-H., Lai, M.M.C., 2009. Hepatitis Delta Virus RNA Replication. *Viruses* 1, 818–831. <https://doi.org/10.3390/v1030818>
- Vance, V., Vaucheret, H., 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* 292, 2277–2280. <https://doi.org/10.1126/science.1061334>
- Verdin, E., Gentit, P., Steyer, S., Wetzels, T., Le Bourgeois, T., Balesdent, M.-H., Binet, F., Biondi, A., Castagnone, P., Deberdt, P., Desneux, N., Desprez Loustau, M.-L., Escobar Gutiérrez, A., Gentsbittel, L., Jactel, H., Makowski, D., Monty, A., Navajas, M., Nesme, X., Robin, M.-H., Verheggen, F., Tayeh, C., 2020. Évaluation du risque simplifiée du tomato brown rugose fruit virus pour la France métropolitaine. Anses éditions.
- Verdin, E., Wipf-Scheibel, C., Gognalons, P., Aller, F., Jacquemond, M., Tepfer, M., 2017. Sequencing viral siRNAs to identify previously undescribed viruses and viroids in a panel of ornamental plant samples structured as a matrix of pools. *Virus Res.* 241, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.019>
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., 2006. First Report of Tomato apical stunt viroid in Tomato in Tunisia. *Plant Dis.* 90, 528–528. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0528A>
- Verhoeven, J.T.J., Koenraad, H.M.S., Westenberg, M., Roenhorst, J.W., 2017a. Characterization of tomato apical stunt viroid isolated from a 24-year old seed lot of *Capsicum annum*. *Arch. Virol.* 162, 1741–1744. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3277-5>
- Verhoeven, J.T.J., Koenraad, H.M.S., Westenberg, M., Roenhorst, J.W., 2017b. Characterization of tomato apical stunt viroid isolated from a 24-year old seed lot of *Capsicum annum*. *Arch. Virol.* 162, 1741–1744. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3277-5>

- Verhoeven, J. th j, Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst, J.W., 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 823–831. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2493-5>
- Virus des solanacées: du génome viral é la protection des cultures MARCHOUX Georges, GOGNALONS Patrick [WWW Document], n.d. . Libr. Lavoisier. URL [https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/virus-des-solanacees-du-genome-viral-e-la-protection-des-cultures/marchoux/descriptif\\_2149402](https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/virus-des-solanacees-du-genome-viral-e-la-protection-des-cultures/marchoux/descriptif_2149402) (accessed 4.4.21).
- Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 1995. . *Arch. Virol. Suppl.* 10, 1–586.
- Vogt, U., Péliissier, T., Pütz, A., Razvi, F., Fischer, R., Wassenegger, M., 2004. Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* 38, 107–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02029.x>
- Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.-M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3275–3280. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400104101>
- Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R.A., Sano, T., 2011. Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. *Virology* 413, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.021>
- Webster, C.G., Rosskopf, E.N., Lucas, L., Mellinger, H.C., Adkins, S., 2014. First Report of Tomato mottle mosaic virus Infecting Tomato in the United States. *Plant Health Prog.* 15, 151–152. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0023>

- Wieczorek, P., Obrępańska-Stępińska, A., 2015. Suppress to Survive—Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol. Biol. Report.* Ispmb 33, 335–346. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0755-8>
- Wille, M., Netter, H.J., Littlejohn, M., Yuen, L., Shi, M., Eden, J.-S., Klaassen, M., Holmes, E.C., Hurt, A.C., 2018. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses* 10, 720. <https://doi.org/10.3390/v10120720>
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., Breaker, R.R., 2004. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428, 281–286. <https://doi.org/10.1038/nature02362>
- Yanagisawa, H., Sano, T., Hase, S., Matsushita, Y., 2019. Influence of the terminal left domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid and potato spindle tuber viroid through pollen. *Virology* 526, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.021>
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 22, 107.
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.-Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4, e3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>
- Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J., 2018. Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 133–140. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0547-4>
- Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J., 2017. Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell. Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0547-4>
- Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., Li, M.M., 2021. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann. Lab. Med.* 41, 25–43. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>

# DEUXIEME PARTIE



# PROJET I



# Étude Bibliographique





## *Avant-propos de la revue*

Le projet I s'inscrit dans la perspective de répondre à la première problématique de notre étude :

Retrouve-t-on dans la littérature des viroïdes ou éléments qui se rapprochent aux viroïdes en dehors du monde végétal, par exemple chez les mammifères dont l'Homme ?

- a. Ces entités seraient-elles à l'origine de toutes les formes existantes d'ARNs dans le monde des vivants ?
- b. Existerait-il un ou des mécanismes de pathogénicité associé à ces petits ARNs nus chez l'homme ?
- c. Quel serait l'impact possible des viroïdes, ou des structures proches des viroïdes, sur la santé des animaux ? Sur celle des vertébrés ?

Ce premier projet qui suit est un article de revue soumis, permettant de donner les éléments de réponse concernant la présence dans le monde animal dont l'Homme d'entités viroïde-like (bien connu chez les plantes, mais en même temps moins connus chez les mammifères).

Très peu de travaux de recherches en virologie font la passerelle entre virologie animale et végétale. En effet, le scientifique T.O. Diener, un pionnier en phytopathologie qui découvrit en 1967 les viroïdes, s'est questionné sur le désintéressement de la communauté scientifique quant à la détection d'entités viroïdes-like en dehors du monde végétal (T. Diener, 2016). Ainsi à ce jour, la présence de viroïdes chez les mammifères n'a pas été étudiée.

Quelques travaux, dont ceux de Delan-Forino et al. en 2011 sur l'AVSVd, responsable du "sunblotch" de l'avocatier et ceux de Friday en 2017 sur le PSTVd, responsable de la maladie des tubercules en fuseau de la pomme de terre, ont montré

que ces deux viroïdes pouvaient infecter et se répliquer *in vitro* dans certaines levures (*Saccharomyces cerevisiae*) bousculant ainsi le dogme d'une association exclusive des viroïdes au règne végétal (Delan-Forino et al., 2011; Friday, 2017).

Au-delà de détecter chez l'humain des ARN viroïdes présents du fait d'une consommation d'aliments infectés ou de contacts avec des végétaux infectés, il apparaissait intéressant de mettre en évidence des ARN viroïde-like, présentant les mêmes caractéristiques que les viroïdes. En effet, il serait intéressant de savoir si de telles entités ne soient présentes que chez les plantes. En pratique, elles ont été peu, voire pas, recherchées. Un état des lieux des connaissances est présenté ci-dessous dans la revue « May viroid-like entities be present in humans ? »

Mots clés : ARN tige-boucle, Viroïdes, Plantes, humains, HDV

## Revue

### **May viroid-like entities be present in humans?**

*Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN, Eric VERDIN,  
Philippe COLSON*



## Article soumis pour publication dans *Annals of the New York Academy of Sciences*

Annals of the New York Academy of Sciences

**ANNALS** of THE NEW YORK  
ACADEMY OF SCIENCES

### May viroid-like entities be present in humans?

Journal:	<i>Ann NY Acad Sci</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bengone-Abogourin, Jessica Grace; IHU Mediterranee Infection, MEPHI Verdin, Eric; INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, CS 60094 Colson, Philippe; IHU Mediterranee Infection, MEPHI
Keywords:	Viroid, stem-loop RNA, cross-kingdom, humans, ribozyme

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<http://www.nyas.org/forthcoming>

## *Plan de Revue*

- Abstract
- Introduction
- Genomic and structural features
- Replication and pathogenicity
- Putative origin
- Hepatitis-causing delta agent: an example of viroid-like entity in humans and other animals
- Putative presence and interactions of viroids, viroid-like entities or their short derived RNAs in animals including humans
- Discussion
- Conclusion
- References

1 **TITLE PAGE**

2  
3 **Type of article:** Review

4  
5 **Full-length title:**

6 **May viroid-like entities be present in humans?**

7 **Short title (for the running head): Viroids and viroid-like RNA in humans.**

8  
9 **Author list:** Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN<sup>1,2</sup>, Eric VERDIN<sup>3</sup>, Philippe  
10 COLSON<sup>1,2\*</sup>

11 **Affiliations:** <sup>1</sup>IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005  
12 Marseille, France; <sup>2</sup> Aix-Marseille Univ., IRD, AP-HM, MEPHI, 27 boulevard Jean  
13 Moulin, 13005 Marseille, France; <sup>3</sup> INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, CS  
14 60094, 84140 Montfavet, France

15 **\* Corresponding author:** Philippe Colson, IHU - Méditerranée Infection, 19-21  
16 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Tel.: +33 413 732 401, Fax: +33 413  
17 732 402; email: philippe.colson@univ-amu.fr

18  
19 **Key words:** Viroid; stem-loop RNA; cross-kingdom; humans; animals; ribozyme;  
20 deltavirus.

21 **Word counts:** abstract, 182; text, 3,671

22 **Figure:** 1; **Table:** 0; **References:** 91



23 **Abstract**

24

25 Viroids were discovered half a century ago. Together with virusoids they are  
26 considered as the smallest pathogens. They are currently known as infecting only  
27 ornamental and food crop plant species. Nevertheless, they are short RNAs with a  
28 stem-loop hairpin harboring structure that is broadly distributed in the living, with  
29 similarities with ribosomal and transfer RNAs, ribozymes, repeated palindromic  
30 elements, or introns and transposons. Some viroids contains a hammerhead ribozyme  
31 motif that is widespred in the biosphere, including in human genes. Moreover, the  
32 Delta agent that causes hepatitis in humans may partly derived from a viroid and  
33 other similar agents were recently discovered in other animals. Here we review the  
34 data that question if viroids or viroid-like entities might be present in and interact  
35 with animals including humans. A possible mechanism could be through RNA  
36 interference. Here we reviewed the data that suggest that viroid-like entities and/or  
37 derived very short RNAs might be present in and interact with animals including  
38 humans. Accumulated data indicate that efforts to detect viroids or viroid-like entities  
39 in humans or other animals should be unbridled in future studies.

40

41

42

## 43 **Introduction**

44 Ivanovsky and Beijerinck reported during the 1890s the existence of infectious agents  
45 smaller than microbes by demonstrating that crushed tobacco leaves with mosaic  
46 disease passed through Chamberland filters could infect healthy plants (Beijerinck,  
47 n.d.; Ivanovsky, 1892). Thereafter and for decades, these agents named ultraviruses  
48 then viruses were considered to be the smallest intracellular entities infecting all  
49 cellular organisms (Lwoff, 1957; Raoult and Forterre, 2008). The concept of a "viroid"  
50 first came up when T.O. Diener reported in 1967 the existence of a still different non  
51 cellular infectious agent, an apparently free nucleic acid, for which no virion could be  
52 detected (Diener and Raymer, 1967). This pathogen newly identified was revealed as  
53 the causative agent of spindle tuber disease of potatoes first reported in 1922 (Martin,  
54 1922) thought for years to be caused by a virus (Diener, 2003). Viroids were further  
55 characterized as minute free infectious RNAs by combining density-gradient  
56 centrifugation and polyacrylamide gel electrophoresis, (Diener, 1971) then by electron  
57 microscopy (Sanger et al., 1976; Sogo et al., 1973) and sequencing (Gross et al., 1978).  
58 The first formal proposal for viroid classification was in 1991 by Elena et al.,(Elena et  
59 al., 1991) then viroids first appeared in the 6<sup>th</sup> report of the International Committee  
60 on Taxonomy of Viruses ("Virus taxonomy, 6th report of the International Committee  
61 on Taxonomy of Viruses," 1995). Viroids are defined as few hundred nucleotides in  
62 length, hence small, circular single-stranded RNAs that do not encode proteins. This  
63 suggests that their information is based on sequence and structure. They replicate  
64 autonomously in higher plants, some of them being known to be pathogenic while  
65 other are not ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/subviral-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids)  
66 [agents/w/viroids](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids)). They were also classified as capsidless orphan replicons, as they  
67 were neither ribosome- or capsid-encoding organisms (Raoult and Forterre, 2008).  
68 Similar entities to viroids are virusoids, which are viroid-like RNAs as short as viroids,  
69 but are encapsulated by a helper virus coat protein (Symons and Randles, 1999). As  
70 opposed to viroids, virusoids are unable to replicate in the absence of a helper virus.

71 Beyond, the one associated with rice yellow mottle virus encodes for a protein  
72 (AbouHaidar et al., 2014).

73         Viroids, as virusoids, are currently known to infect only plants; viroids being  
74 significant pathogens infecting ornamental and food crop plant species (Diener, 2018,  
75 1993; Flores et al., 2004; Navarro et al., 2012). Thus, neither viroids nor viroid-like  
76 entities were described in other organisms. Nevertheless, they were almost not  
77 searched (T. Diener, 2016). In addition, in the case of viruses, the border between plant  
78 and animal kingdoms has been reported to be less hermetical than widely admitted.  
79 Particularly, very closely related viruses differing only slightly regarding their  
80 genomic content have been found to infect animals or plants (T. Diener, 2016; Koonin  
81 and Dolja, 2013). In addition, there are evidence of the nonneutral presence of plant  
82 viruses in humans (Aguado-García et al., 2020; Baliqque et al., 2015b; Kim et al., 2020).  
83 Moreover, the Delta agent that causes hepatitis in humans in co-infection with  
84 hepatitis B shares viroid-like features (Flores et al., 2012a). Indeed, its RNA genome  
85 has structural similarities with viroids, including a ribozyme domain, and it is deemed  
86 to result from the fusion of a viroid-like RNA with a coding sequence from mammals.  
87 Here we summarize the data suggesting that viroid-like entities might be present in  
88 and interact with animals including humans (Figure 1).

89

## 90 **Genomic and structural features**

91 Viroids are very unique subviral, obligate parasites (“Virus taxonomy, 6th report of  
92 the International Committee on Taxonomy of Viruses,” 1995);  
93 [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/subviral-agents/w/viroids](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids).  
94 There are two families, *Pospiviroidae* and *Awsunviroidae*. They consist in genomic  
95 single-stranded, circular, unencapsidated RNAs with a size varying between 246 and  
96 475 nucleotides, and a palindromic, stem-loop hairpin harboring rod-like or quasi-  
97 rod-like conformation of about 50 nm in length *in vitro* (Flores et al., 2012b).  
98 *Pospiviroidae* members have a central conserved region and cannot form hammerhead

99 ribozymes. *Avsunviroidae* members lack a central conserved region and can form  
100 hammerhead ribozymes. These nano-genomes have a high G+C content, which ranges  
101 between 53 and 60%, with the exception of avocado sunblotch viroid (G+C content of  
102 38%), and a high level of base pairing ([https://talk.ictvonline.org/ictv-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids)  
103 [reports/ictv\\_online\\_report/subviral-agents/w/viroids](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids)). They do not harbor protein  
104 encoding genes. In contrast, the virusoid that is associated with rice yellow mottle  
105 virus and is the smallest of known viroids and virusoids, has two or three overlapping  
106 ORFs that can be directly translated. It is the single one to encode a protein, which is  
107 16-kDa in length and highly basic (AbouHaidar et al., 2014). Such a restricted genomic  
108 RNA size along with a high G+C content and a high level of base pairing confer to  
109 viroids a high stability (Diener, 1989). Notably, circular, covalently closed RNA with  
110 a high level of base pairing and stem-loop RNA conformations are indeed less prone  
111 to be processed by nucleases (Flores et al., 2011; Seligmann and Raoult, 2016). They  
112 can be protected from the action of host endonucleases, potential host RNA silencing  
113 activities.

114

## 115 **Replication and pathogenicity**

116 The members of viroid families *Pospiviroidae* and *Avsunviroidae* use two separate ways  
117 to replicate (Di Serio et al., 2018; Flores et al., 2014, 2011). *Pospiviroidae* members  
118 replicate in the nucleus by an asymmetric rolling-circle replication pathway, and  
119 *Avsunviroidae* members replicate in the chloroplast by a symmetric rolling-circle  
120 mechanism. Both these autonomous replication pathways involve RNA generation by  
121 the nuclear RNA polymerase II (family *Pospiviroidae*) or a chloroplastic RNA  
122 polymerase (family *Avsunviroidae*) and cleavage and ligation steps either by host cell  
123 enzymes that recognize particular RNA motifs (family *Pospiviroidae*) or by the  
124 hammerhead ribozyme activity (family *Avsunviroidae*).

125 Although processed viroid RNA genomes do not encode any structural or other  
126 types of proteins, they cause diseases of infected plants. The mechanisms of this

127 pathogenicity are not fully clarified and they may be multiple. They may notably  
128 involve viroid RNA processing by the RNA silencing machinery and the interaction  
129 of mature viroid RNA with host factors (Navarro et al., 2012). The involvement of  
130 silencing components in the pathogenesis of viroids has been reported in different  
131 host plants (Markarian et al., 2004; Martínez de Alba et al., 2002). Viroids are inducers  
132 as well as targets of mechanisms involving RNA silencing since they are substrates for  
133 the Dicer-like endoribonucleases (Owens and Hammond, 2009; Vogt et al., 2004).  
134 Pathogenicity could occur through accumulation of viroid-derived 21-24 nucleotide  
135 long RNA (Minoia et al., 2014; Navarro and Di Serio, 2018; Wang et al., 2011). The  
136 cleavage of host messenger RNAs (mRNAs) resulting from RNA silencing mediated  
137 by viroid-derived-silencing (si)RNAs may down-regulate host mRNAs, which could  
138 result in either loss or gain of protein functions (Adkar-Purushothama et al., 2017;  
139 Navarro et al., 2012; Owens and Hammond, 2009). Alike microRNAs, viroids may pair  
140 to multiple mRNA targets at their 3' or 5' conserved seed regions (Bengone-Abogourin  
141 et al., 2020; Lam et al., 2015; Lewis et al., 2003). Moreover, Argonaute proteins that are  
142 essential components of the RNA-induced silencing complex were reported to be  
143 overexpressed and associated with viroid derived-sRNAs in *Nicotiana benthamiana*  
144 infected by potato spindle tuber viroid, as previously demonstrated for the case of  
145 endogenous RNAs and RNAs derived from viruses (Minoia et al., 2014). This  
146 overexpression of Argonaute proteins decreased viroid accumulation suggesting their  
147 role in the defense against viroid.

148

149 Besides, *in vivo* studies performed on tomato leaves reported that CEVd  
150 increased the activation of cell death cascade and induced ribosomal subunits  
151 malfunctioning (Cottilli et al., 2019). Alterations in the accumulation of ribosomal  
152 proteins or translation factors have been detected in tomato plants infected with CEVd  
153 (Lisón et al., 2013) and interaction of viroids with ribosomal protein L5 or eukaryotic  
154 translation elongation factor 1A have been reported (Dubé et al., 2009; Eiras et al.,  
155 2011; Lisón et al., 2013). In addition, PSTVd infection was reported to trigger ribosomal

156 protein S3a-like mRNAs degradation in tomatoes (Adkar-Purushothama et al., 2017)  
157 and Hop stunt viroid (HSVd) was reported to impact DNA methylation of plant host  
158 ribosomal RNA genes (Martinez et al., 2014). Otherwise, it was reported that PSTVd  
159 may activate protein kinases and consequently signaling cascades that might result in  
160 perturbations of plant defense and hormone signaling pathways (Navarro et al., 2012;  
161 Owens and Hammond, 2009).

162

### 163 **Putative origin**

164 There are different hypotheses in the literature discussing about the origins of the  
165 viroids. In 1989, Diener proposed the idea that viroids might be archaic living fossils,  
166 pre-existing long before the apparition of nearly all forms of genetic systems such as  
167 the cellular RNAs (ribosomal, messenger and transfer) or DNA, making viroids  
168 remains of a pre-cellular RNA world at Life origin (T. Diener, 2016; Friday, 2017;  
169 López-Carrasco et al., 2017). As a matter of fact, viroids are fulfilling the main features  
170 of pre-cellular genetic systems parenting all genomic forms, being small-circular-  
171 covalently closed hairpin-looped-catalytic RNAs, with endowed autonomous  
172 replication properties. In the same line, Seligmann and Raoult reported that the stem-  
173 loop RNA conformation might be at the origin of ancient and current parasitic and  
174 non- parasitic RNAs (Seligmann and Raoult, 2018). They have particularly pointed out  
175 strong structural similarities between viroids and other short RNAs with stem-loop  
176 hairpins that are central in the living, such as ribosomal RNAs (including 5S and 23S  
177 rRNAs) and transfer RNAs, ribozymes, repeated palindromic elements, or introns and  
178 transposons (Seligmann and Raoult, 2018, 2016) (Figure 1).

179

180 Hammerhead ribozymes are small RNA endonuclease. They were originally  
181 reported as present in plant virus satellite RNAs and in viroids of family *Avsunviroidae*  
182 (Hammann and Steger, 2012). They act in the processing of rolling circle transcripts.  
183 They lack any coding capacity. Nonetheless, they are active parts of the ribosome, the

184 catalytic activity of which relies on a ribozyme that is involved in peptide synthesis  
185 and another one, the RNase P, is involved in the processing of ribosomal RNA and  
186 precursors of transfer RNA (Moelling and Broecker, 2019; “The Ribosome Is a  
187 Ribozyme | Science,” n.d.). Hammerhead ribozymes have been shown to be  
188 ubiquitous among the tree of Life.(de la Peña and García-Robles, 2010a) They have  
189 been detected in bacteria (Winkler et al., 2004). In *Bacillus subtilis*, control of a  
190 metabolite gene was reported to be mediated by the self-cleaving activity of a  
191 ribozyme embedded in its 5' UTR (Winkler et al., 2004). Hammerhead ribozymes have  
192 been also reported in archaea (Gupta and Swati, 2017). Moreover, they have been  
193 described in various newt species, (Epstein and Gall, 1987) cave crickets, (Rojas et al.,  
194 2000) *Schistosoma mansoni*, (Osborne et al., 2005) in the genomes of amphibians and  
195 platyhelminth parasites as well as in those of *Amniota* members among which reptiles,  
196 birds, and mammals including humans (de la Peña and García-Robles, 2010a, 2010b)  
197 (Figure 1).

198

### 199 **Hepatitis-causing delta agent: an example of viroid-like entity in humans and other** 200 **animals**

201 The Delta agent (HDV) is the causative agent of hepatitis Delta (Magnius et al., 2018;  
202 Rizzetto et al., 1977; Rizzetto and Stroffolini, 2021). It is pathogenic in humans in  
203 coinfection with hepatitis B virus. The viral RNA only encodes for two proteins, the  
204 small (S-HDAg, p24) and large (L-HDAg, P27) delta antigens (Magnius et al., 2018).  
205 Both proteins are involved in replication and virus assembly, respectively (Tseng and  
206 Lai, 2009). These two nucleoproteins associated to the genomic RNA are wrapped and  
207 protected by the hepatitis B virus envelope. As Delta agent requires HBV envelope for  
208 cell entry, viral assembly, packaging and cell exit, it has been classified as a satellite  
209 virus or HBV-dependent virus (Botelho-Souza et al., 2017; Wille et al., 2018). A link  
210 has been reported between viroids and Delta agent (Elena et al., 1991; Flores et al.,  
211 2012a). Both entities share striking similarities with single-stranded, stem-loop, self-  
212 complementary, circular RNA genomes. The Delta agent is only 4-7 times bigger than

213 viroids, with about 1.7 kilobases (kb). It also displays a high level of self-  
214 complimentary (nearly 70%) and forms a highly base-paired rod-like structure  
215 (Magnius et al., 2018). Moreover, delta agent and viroids share the rolling cycle  
216 replication mode of their genomic RNA (Flores et al., 2012a; Lasda and Parker, 2014).  
217 Most importantly, the Delta agent RNA contains a ribozyme. It was suggested that  
218 Delta agent evolved from the fusion of two types of RNAs : a viroid-like RNA  
219 containing ribozyme sequences and the Delta antigen RNA coding sequence, which  
220 may share a common ancestor with a protein named delta-interacting protein A  
221 (DIPA) and present in human tissues (Brazas and Ganem, 1996; Elena et al., 1991;  
222 Robertson, 1996; Taylor and Pelchat, 2010). These data question if human hepatitis  
223 delta agent extend viroids to the animal kingdoms? (Figure 1).

224

225 The Delta agent is known to be transmissible to non-human mammals such as  
226 chimpanzees and to woodchucks *Marmota monax* experimentally in the presence of its  
227 helper virus (Magnius et al., 2018). Until year 2018, Delta agents were unknown in  
228 other hosts than humans (Szirovicza et al., 2020). Since then, two meta-transcriptomics  
229 analysis identified the genomes of an avian HDV-like agent in ducks (Wille et al., 2018)  
230 and of an snake HDV-like agent in a *Boa constrictor* (Hetzl et al., 2019). The existence  
231 of highly divergent deltaviruses has been unveiled in various animals including  
232 rodents (spini rat), (Paraskevopoulou et al., 2020) fishes, (Chang et al., 2019)  
233 amphibians (toad, newt), (Chang et al., 2019) or termites (Chang et al., 2019). These  
234 latter novel HDV-like viruses did not appear to be associated with hepadnavirus  
235 infection. Also, in contrast to the human delta virus, the rodent delta virus does not  
236 express the large and small delta antigens, nor appears to require a helper virus co-  
237 infection (Paraskevopoulou et al., 2020). In addition, Szirovicza et al. reported snake  
238 Delta virus replication in cultured boa constrictor cells superinfected with  
239 reptarenaviruses and hartmaniviruses, suggesting that deltaviruses can likely use  
240 several helper viruses (Szirovicza et al., 2020). Moreover, snake delta antigen was  
241 reported to be highly expressed in other cells including brain cells, renal tubular



242 epithelial cells, lung epithelial cells and leukocytes, indicating that the snake  
243 deltavirus might not only show tropism for liver cells (Hetzl et al., 2019). Finally, a  
244 search for self-cleaving RNAs from the human genome detected a Delta agent-like  
245 sequence in a human gene (*CPEB3*) that is part of a family of genes that regulate  
246 messenger RNA polyadenylation (Salehi-Ashtiani et al., 2006). Taken together these  
247 findings suggest that Delta agent-like entities may be more numerous than previously  
248 thought (Figure 1).

249

### 250 **Putative presence and interactions of viroids, viroid-like entities or their short derived** 251 **RNAs in animals including humans**

252

#### 253 *Possible contacts and transmission of viroid or viroid-like entities to humans*

254 Viroids are known to infect only plant species and most significantly plants of  
255 agronomic interest such as pepper, citrus, eggplant, apple, potato, hop, peach, coleus,  
256 grapevine, avocado and coconut palm trees, as well as ornamental plants such as  
257 chrysanthemums (Verdin et al., 2017). They are well-known to cause disease in  
258 tomatoes (Antignus et al., 2002) or potatoes (Tangkanchanapas et al., 2020) *Citrus*  
259 *exocortis viroid* (CEVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), and *Tomato apical stunt*  
260 *viroid* (TASVd) were identified in multiple food crop outbreaks worldwide,  
261 (Verhoeven et al., 2004) including in Tunisia, (Verhoeven et al., 2006) Senegal,  
262 (Candresse et al., 2007b) Slovenia (Marn and Pleško, 2012) and Taiwan (Candresse et  
263 al., 2007b; Marn and Pleško, 2012 ; Verhoeven et al., 2017b). Generally, viroids of the  
264 family *Pospiviroidae* that includes *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) mostly infect  
265 *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* and various ornamental  
266 species of the family *Solanaceae*. Viroids can cause mild to severe infections, including  
267 with obvious physical damages in crops species (Panno et al., 2019). But they can also  
268 determine asymptomatic or latent infections in plant crops (Hammond and Owens,  
269 2006) and in ornamental plant species (Navarro and Di Serio, 2018; Verdin et al., 2017),  
270 especially in the members of the family *Solanaceae*. Considering the prevalence of

271 viroids in various plants including some that are part of our diet, it is therefore likely  
272 that humans are in contact or ingest viroids (Figure 1).

273

274 *Putative mechanisms of interaction of viroids or viroid-like entities with humans*  
275 *and other animals* (Figure 1)

276

277 Recent data have highlighted that deltaviruses were more diverse than previously  
278 thought and were not restricted in their host, helper virus, if any, and tissue tropism  
279 (Chang et al., 2019; Hetzel et al., 2019; Paraskevopoulou et al., 2020; Szivovics et al.,  
280 2020; Wille et al., 2018). Therefore, unidentified deltaviruses may be present in  
281 humans with a helper virus distinct from hepatitis B virus or without helper virus. As  
282 viroids of the family *Ausunviroidae* contains hammerhead ribozymes, the ubiquity  
283 of these latter in the biosphere are of interest. Hammerhead ribozymes were detected  
284 for instance in the worm *Schistosoma mansoni*, (Ferbeyre et al., 1998) in crickets, (Rojas  
285 et al., 2000) and in various other eukaryotes, (Seehafer et al., 2011) and they were also  
286 reported in the human microbiome (Jimenez et al., 2011; Riccitelli et al., 2014). In  
287 addition, de la Pena et al. detected bioinformatically hundreds of hammerhead  
288 ribozyme motifs, in association with retrotransposable elements, in the genomes of  
289 lower metazoans and vertebrates (de la Peña and García-Robles, 2010b). Martick et al.  
290 reported that a highly active hammerhead ribozyme was embedded in a rodent  
291 messenger RNA, in the 3' UTRs of C-type lectin type II genes, being capable to  
292 decrease protein expression in mouse cells (Martick et al., 2008). Moreover,  
293 hammerhead ribozymes were found to be ultraconserved intronic elements in the  
294 human genome, in a tumour suppressor gene, and in a mammalian tumour antigen  
295 gene (de la Peña and García-Robles, 2010a). Also, Salehi-Ashtiani et al. detected self-  
296 cleaving RNAs in the human genome, including one sequence, conserved in  
297 mammals, located in an intron of the CPEB3 gene, which belongs to a gene family  
298 involved in messenger RNA polyadenylation regulation; this CPEB3 ribozyme was  
299 reported as structurally and biochemically related to the Delta agent ribozymes

300 (Salehi-Ashtiani et al., 2006). Otherwise, transcriptional termination by RNA  
301 polymerase II of the human beta-globin gene revealed a co-transcriptional cleavage  
302 (CoTC) process of the pre-messenger RNA that involves a ribozyme RNA self-  
303 cleaving activity (Teixeira et al., 2004).

304

305 Beyond, viroids and/or viroid-derived small RNAs might have the potential to  
306 cross kingdoms, and interact with human cells. It is worthy to note that *Avocado*  
307 *sunblotch viroid* was reported to replicate in a cyanobacterium and in the yeast  
308 *Saccharomyces cerevisiae* (Delan-Forino et al., 2011; Friday, 2017; Hill et al., 2014).  
309 Moreover, Daros et al engineered hammerhead *Eggplant Latent viroid*-derived system,  
310 allowing tremendous production of mature viroid-monomers that accumulate in  
311 *Escherichia coli* (Daròs et al., 2018a). Beyond, a possible mechanism of interaction of  
312 viroid or viroid-like RNAs with humans and other animals may involve RNA  
313 interference (RNAi) and vertebrate cell deregulation (Figure 1). Viroids and miRNAs  
314 are naked RNA with non-coding properties that implicate ribonuclease and dicer  
315 complexes to generate small RNA units (Itaya et al., 2007; Zhao et al., 2018). As for the  
316 case of the miRNA precursors, viroids have stem-loop like conformations.(Flores et  
317 al., 2005; Seligmann and Raoult, 2016). In addition, specific single-stranded RNA with  
318 a size similar to that of miRNAs and endogenous small interfering RNAs were  
319 recently detected during viroid infection (Ding and Itaya, 2007; Hammann and Steger,  
320 2012). This was observed in plants infected with *Potato spindle tuber viroid*,(Itaya et al.,  
321 2007; Machida et al., 2007) *Citrus exocortis viroid* (Martín et al., 2007) and *Peach latent*  
322 *mosaic viroid* (St-Pierre et al., 2009). We recently described 100% identity between  
323 viroid fragments and the seed region that is involved in the RNA interference process  
324 of diverse human miRNAs (Bengone-Abogourin et al., 2020). Several human cancers  
325 seem associated with miRNA deregulation and miRNA patterns have been reported  
326 in association with many tumour-specific and cell lineage-specific patterns (Croce,  
327 2009; Olson et al., 2009). Interestingly, exogenous small RNAs such as miRNAs have  
328 been shown capable to spread between cells (Chitwood and Timmermans, 2010). It is

329 also worthy to note that exogenous plant miRNAs were reported to be stable in  
330 cooked food (Zhang et al., 2012, p. 1). In addition, it was reported that plant and  
331 animal miRNAs might have potential to cross kingdoms (Zhao et al., 2017). Thus,  
332 exogenous plant miRNAs were detected in the blood from humans and animals  
333 (calves) in high amounts (Zhang et al., 2012, p. 1). Particularly, the miRNA-168a from  
334 rice was detected in the blood of Chinese individuals whose main diet was rice-based.  
335 In addition, this plant miRNA was described as able to bind to the low-density  
336 lipoprotein receptor adapter protein 1 (LDLRAP1) mRNA and subsequently down-  
337 regulate its expression in hepatocytes (Zhang et al., 2012, p. 1). Moreover, plants and  
338 animals were reported to share miRNAs of the same family (miR854 family) (Arteaga-  
339 Vázquez et al., 2006). Thus, miR854 and miR855 were identified in *Arabidopsis thaliana*  
340 that have multiple binding sites in the 3' untranslated region (3'UTR) of a gene  
341 encoding oligouridylylate binding protein1b (UBP1b), while miR854 family members  
342 were reported to be expressed in *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* and *Homo*  
343 *sapiens*, with imperfectly matching binding sites in the 3'UTR of genes encoding a T-  
344 cell intracellular antigen-related protein that is a heterogeneous nuclear  
345 ribonucleoprotein of the UBPI family. Overall, these findings suggest that viroids or  
346 viroid-like entities could modulate human cellular gene expression via miRNA or  
347 miRNA-like molecules. MiRNA-like RNAs derived from viroids may be transferred  
348 from plants to humans or processed, in human cells, from viroids. They might interact  
349 with human messenger RNAs. Hence, replication of the viroids or viroid-like entities  
350 in human cells would not be necessary for such interactions. Finally, it is also possible  
351 that short stem-loop hairpins could integrate genomes and be transcribed and  
352 replicated (Seligmann and Raoult, 2016).

353

354

355 **Conclusion**

356 T.O. Diener noted very few efforts to search for a counterpart of viroids in humans  
357 and non-human mammals (“Diener TO. On the existence of animal viroids. 5 ed. 2020.  
358 Journal of Virology & Antiviral Research 5;4:1-3. doi:10.417,” n.d.). For more than two  
359 centuries, plant virologists focused their interests on the impact of phytoviruses in  
360 plants, likewise animal virologists were focused on the impact of animal viruses on  
361 humans and other vertebrate animals. Here, we have notably mentioned the  
362 production of viroid nucleic acids in yeast or bacteria, the existence of likely viroid-  
363 derived components in Delta agent in humans and many other animals, the  
364 ubiquity of ribozymes as those present in some viroids, the existence of viroid-  
365 derived short RNAs, and we questioned if viroids, viroid-like entities, or their derived  
366 short RNAs may interact with human cells. As a matter of fact, the restriction of such  
367 entities as viroids to the plant kingdom would be surprising. Efforts to detect viroids  
368 or viroid-like entities in humans, or other animals should be unbridled in future  
369 studies. In this view, it should be considered that viroids or viroid-like entities or  
370 derived RNAs could be associated with pathogenicity or alternatively may have  
371 beneficial effects.

372

373 **Funding**

374 This work was supported by the French Government under the “Investments for the  
375 Future” program managed by the National Agency for Research (ANR),  
376 Méditerranée-Infection 10-IAHU-03. Mrs Jessica Grace Bengone Abogourin received  
377 a grant from the IHU Méditerranée Infection foundation.

378

379 **Conflicts of interest**

380 The authors have no conflicts of interest to declare. Funding sources had no role in the  
381 design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation  
382 of the data; and preparation, review, or approval of the manuscript.

383 **References**

- 384 AbouHaidar, M.G., Venkataraman, S., Golshani, A., Liu, B., Ahmad, T., 2014. Novel  
385 coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed  
386 circular RNA of 220 nt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14542–14547.  
387 <https://doi.org/10.1073/pnas.1402814111>
- 388 Adkar-Purushothama, C.R., Iyer, P.S., Perreault, J.-P., 2017. Potato spindle tuber  
389 viroid infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like  
390 and Ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Sci. Rep.* 7, 8341.  
391 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08823-z>
- 392 Aguado-García, Y., Taboada, B., Morán, P., Rivera-Gutiérrez, X., Serrano-Vázquez, A.,  
393 Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximénez, C.,  
394 Arias, C.F., 2020. Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx  
395 and gut of infants during their first year of life. *Sci. Rep.* 10, 13595.  
396 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>
- 397 ANSES/LSV/MA034 - Version 2, n.d. 20.
- 398 Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid  
399 (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and  
400 bumble bee activity. *Plant Dis.* 91, 47–50.
- 401 Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Gofman, R., Bar-Joseph, M., 2002. A new  
402 disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain of Tomato  
403 apical stunt viroid (TASVd). *Phytoparasitica* 30, 502–510.
- 404 Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., Vielle-Calzada, J.-P., 2006. A Family of  
405 MicroRNAs Present in Plants and Animals. *Plant Cell* 18, 3355–3369.  
406 <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044420>
- 407 Astbury, S., Costa Nunes Soares, M.M., Peprah, E., King, B., Jardim, A.C.G., Shimizu,  
408 J.F., Jalal, P., Saeed, C.H., Sabeer, F.T., Irving, W.L., Tarr, A.W., McClure, C.P.,  
409 2020. Nanopore sequencing from extraction-free direct PCR of dried serum  
410 spots for portable hepatitis B virus drug-resistance typing. *J. Clin. Virol. Off.*

- 411 Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 129, 104483.  
412 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104483>
- 413 Balique, F., 2013. Détection et impact potentiel des tobamovirus chez l'homme 212.
- 414 Balique, F., Colson, P., Barry, A.O., Nappes, C., Ferretti, A., Moussawi, K.A., Ngounga,  
415 T., Lepidi, H., Ghigo, E., Mege, J.-L., Lecoq, H., Raoult, D., 2013. Tobacco Mosaic  
416 Virus in the Lungs of Mice following Intra-Tracheal Inoculation. PLOS ONE 8,  
417 e54993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054993>
- 418 Balique, F., Colson, P., Raoult, D., 2012. Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva  
419 of smokers. J. Clin. Virol. 55, 374–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.012>
- 420 Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., Colson, P., 2015a. Can Plant Viruses Cross the  
421 Kingdom Border and Be Pathogenic to Humans? Viruses 7, 2074–2098.  
422 <https://doi.org/10.3390/v7042074>
- 423 Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., Colson, P., 2015b. Can Plant Viruses Cross the  
424 Kingdom Border and Be Pathogenic to Humans? Viruses 7, 2074–2098.  
425 <https://doi.org/10.3390/v7042074>
- 426 Beijerinck, n.d. Ueber ein Contagium vivurn fluidum als Ursaehe der  
427 Fleekenkrankheit der Tabaksblätter 24.
- 428 Bengone-Abogourin, J.G., Chelkha, N., Verdin, E., Colson, P., 2020. Sequence  
429 Similarities between Viroids and Human MicroRNAs. Intervirology 1–8.  
430 <https://doi.org/10.1159/000509212>
- 431 Botelho-Souza, L.F., Vasconcelos, M.P.A., dos Santos, A. de O., Salcedo, J.M.V., Vieira,  
432 D.S., 2017. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. Virol. J. 14.  
433 <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0845-y>
- 434 Brass, J.R.J., Owens, R.A., Matoušek, J., Steger, G., 2017. Viroid quasispecies revealed  
435 by deep sequencing. RNA Biol. 14, 317–325.  
436 <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272745>
- 437 Brazas, R., Ganem, D., 1996. A Cellular Homolog of Hepatitis Delta Antigen:  
438 Implications for Viral Replication and Evolution. Science 274, 90–94.  
439 <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.90>

- 440 Bussière, F., Lafontaine, D., Côté, F., Beaudry, D., Perreault, J.P., 1995. Evidence for a  
441 model ancestral viroid. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 143–144.
- 442 Candresse, T., Marais, A., Ollivier, F., Verdin, E., Blancard, D., 2007a. First Report of  
443 the Presence of *Tomato apical stunt viroid* on Tomato in Sénégal. *Plant Dis.* 91,  
444 330–330. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0330C>
- 445 Candresse, T., Marais, A., Ollivier, F., Verdin, E., Blancard, D., 2007b. First Report of  
446 the Presence of *Tomato apical stunt viroid* on Tomato in Sénégal. *Plant Dis.* 91,  
447 330–330. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-3-0330C>
- 448 Castello, J.D., Rogers, S.O., Starmer, W.T., Catranis, C.M., Ma, L., Bachand, G.D., Zhao,  
449 Y., Smith, J.E., 1999. Original Paper.
- 450 Chang, W.-S., Pettersson, J.H.-O., Le Lay, C., Shi, M., Lo, N., Wille, M., Eden, J.-S.,  
451 Holmes, E.C., 2019. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and  
452 invertebrates. *Virus Evol.* 5. <https://doi.org/10.1093/ve/vez021>
- 453 Chitwood, D.H., Timmermans, M.C., 2010. Small RNAs are on the move. *Nature* 467,  
454 415.
- 455 Colson, P., Borentain, P., Ravaux, I., Aherfi, S., 2020a. Hepatitis B Virus Genomics  
456 Knocking at the Door of Routine Diagnostic Laboratories. *J. Infect. Dis.* 221,  
457 1026–1029. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz544>
- 458 Colson, P., Lagier, J.-C., Baudoin, J.-P., Bou Khalil, J., La Scola, B., Raoult, D., 2020b.  
459 Ultrarapid diagnosis, microscope imaging, genome sequencing, and culture  
460 isolation of SARS-CoV-2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc.*  
461 *Clin. Microbiol.* 39, 1601–1603. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03869-w>
- 462 Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.-J., Berbis, P., Lecoq,  
463 H., Harlé, J.-R., Berland, Y., Raoult, D., 2010. Pepper Mild Mottle Virus, a Plant  
464 Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains,  
465 and Pruritus in Humans. *PLOS ONE* 5, e10041.  
466 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010041>



- 467 Conti, G., Rodriguez, M.C., Venturuzzi, A.L., Asurmendi, S., 2017. Modulation of host  
468 plant immunity by Tobamovirus proteins. *Ann. Bot.* 119, 737–747.  
469 <https://doi.org/10.1093/aob/mcw216>
- 470 Cottilli, P., Belda-Palazón, B., Adkar-Purushothama, C.R., Perreault, J.-P., Schleiff, E.,  
471 Rodrigo, I., Ferrando, A., Lisón, P., 2019. Citrus exocortis viroid causes  
472 ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Res.* gkz679.  
473 <https://doi.org/10.1093/nar/gkz679>
- 474 Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.  
475 *Nat. Rev. Genet.* 10, nrg2634. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>
- 476 Dadami, E., Dalakouras, A., Wassenegger, M., 2017. Viroids and RNA Silencing, in:  
477 Viroids and Satellites. Elsevier, pp. 115–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00011-5>
- 479 Dalakouras, A., Dadami, E., Wassenegger, M., 2013. Viroid-induced DNA methylation  
480 in plants. *Biomol. Concepts* 4, 557–565. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0030>
- 481 Dall, D., Penrose, L., Daly, A., Constable, F., Gibbs, M., 2019. Prevalences of  
482 Pospiviroid Contamination in Large Seed Lots of Tomato and Capsicum, and  
483 Related Seed Testing Considerations. *Viruses* 11, 1034.  
484 <https://doi.org/10.3390/v11111034>
- 485 Daròs, J.-A., Aragonés, V., Cordero, T., 2018a. A viroid-derived system to produce  
486 large amounts of recombinant RNA in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8.  
487 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- 488 Daròs, J.-A., Aragonés, V., Cordero, T., 2018b. A viroid-derived system to produce  
489 large amounts of recombinant RNA in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8, 1904.  
490 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- 491 Daròs, J.-A., Flores, R., 2004. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for  
492 replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Natl.*  
493 *Acad. Sci.* 101, 6792–6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401090101>

- 494 de Bernardis, E., Busà, L., 2020. A putative role for the tobacco mosaic virus in  
495 smokers' resistance to COVID-19. *Med. Hypotheses* 143, 110153.  
496 <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110153>
- 497 de la Peña, M., García-Robles, I., 2010a. Intronic hammerhead ribozymes are  
498 ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.* 11, 711–716.  
499 <https://doi.org/10.1038/embor.2010.100>
- 500 de la Peña, M., García-Robles, I., 2010b. Ubiquitous presence of the hammerhead  
501 ribozyme motif along the tree of life. *RNA N. Y. N* 16, 1943–1950.  
502 <https://doi.org/10.1261/rna.2130310>
- 503 Delan-Forino, C., Maurel, M.-C., Torchet, C., 2011. Replication of Avocado Sunblotch  
504 Viroid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 85, 3229–3238.  
505 <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-10>
- 506 Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.Th.J., Li, S.-F., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T.,  
507 Vidalakis, G., Owens, R.A., 2014. Current status of viroid taxonomy. *Arch.*  
508 *Virol.* 159, 3467–3478. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- 509 Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R.A., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T.,  
510 Verhoeven, J.T.J., Vidalakis, G., Flores, R., Ictv Report Consortium, null, 2018.  
511 ICTV Virus Taxonomy Profile: *Avsunviroidae*. *J. Gen. Virol.* 99, 611–612.  
512 <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>
- 513 Di Serio, F., Li, S.-F., Pallás, V., Owens, R.A., Randles, J.W., Sano, T., Verhoeven, J.Th.J.,  
514 Vidalakis, G., Flores, R., 2017. Viroid Taxonomy, in: *Viroids and Satellites*.  
515 Elsevier, pp. 135–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00013-9>
- 516 Diener, T., 2016. Viroids: “living fossils” of primordial RNAs? *Biol. Direct* 11.  
517 <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0116-7>
- 518 Diener, T.O., 2018. Of Viroids and Prions. *Viruses* 10.  
519 <https://doi.org/10.3390/v10120663>
- 520 Diener, T.O., 2003. Discovering viroids — a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.*  
521 1, 75–80. <https://doi.org/10.1038/nrmicro736>

- 522 Diener, T.O., 1999. Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol. Suppl.* 15,  
523 203–220. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6425-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6425-9_15)
- 524 Diener, T.O., 1993. Hepatitis delta virus-like agents: an overview. *Prog. Clin. Biol. Res.*  
525 382, 109–115.
- 526 Diener, T.O., 1989. Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc. Natl. Acad.*  
527 *Sci.* 86, 9370–9374.
- 528 Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular  
529 weight RNA. *Virology* 45, 411–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)  
530 4
- 531 Diener TO. On the existence of animal viroids. 5 ed. 2020. *Journal of Virology &*  
532 *Antiviral Research* 5;4:1-3. doi:10.417, n.d.
- 533 Diener, T.O., Owens, R.A., 1980. Viroids, in: Hahn, F.E., Kersten, H., Kersten, W.,  
534 Szybalski, W. (Eds.), *Progress In Molecular and Subcellular Biology, Progress*  
535 *In Molecular and Subcellular Biology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 235–  
536 252. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-67701-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67701-4_5)
- 537 Diener, T.O., Raymer, W.B., 1967. Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with  
538 Properties of a Free Nucleic Acid. *Science* 158, 378–381.  
539 <https://doi.org/10.1126/science.158.3799.378>
- 540 Ding, B., Itaya, A., 2007. Viroid: a useful model for studying the basic principles of  
541 infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 20, 7–20.  
542 <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007>
- 543 Ding, X., Shintaku, M.H., Carter, S.A., Nelson, R.S., 1996. Invasion of minor veins of  
544 tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in  
545 phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11155–11160.  
546 <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11155>
- 547 Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.-H., Folimonov, A., Hou, Y.-M., Bao, Y., Katagi, C., Carter,  
548 S.A., Nelson, R.S., 2004. The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated  
549 with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol. Plant-*

- 550 Microbe Interact. MPMI 17, 583–592.  
551 <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.583>
- 552 Dubé, A., Bisaillon, M., Perreault, J.-P., 2009. Identification of proteins from prunus  
553 persica that interact with peach latent mosaic viroid. *J. Virol.* 83, 12057–12067.  
554 <https://doi.org/10.1128/JVI.01151-09>
- 555 Eiras, M., Nohales, M.A., Kitajima, E.W., Flores, R., Daròs, J.A., 2011. Ribosomal  
556 protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind in vitro  
557 specifically Potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* 156, 529–533.  
558 <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0867-x>
- 559 Elena, S.F., DoPAZO, J., FLORESt, R., Moya, S., 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike  
560 satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis 6 virus RNA. *Proc Natl*  
561 *Acad Sci USA* 4.
- 562 Epstein, L.M., Gall, J.G., 1987. Transcripts of Newt Satellite DNA Self-cleave In Vitro.  
563 *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 261–265.  
564 <https://doi.org/10.1101/SQB.1987.052.01.031>
- 565 Évaluation du risque simplifiée du ToBRFV pour le FRANCE METROPOLOITAINE  
566 .pdf, n.d.
- 567 Feldstein, P.A., Hu, Y., Owens, R.A., 1998. Precisely full length, circularizable,  
568 complementary RNA: An infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc.*  
569 *Natl. Acad. Sci.* 95, 6560–6565. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6560>
- 570 Ferbeyre, G., Smith, J.M., Cedergren, R., 1998. Schistosome satellite DNA encodes  
571 active hammerhead ribozymes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3880–3888.  
572 <https://doi.org/10.1128/mcb.18.7.3880>
- 573 Flores, R., 2001a. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest  
574 known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie*  
575 324, 943–952.
- 576 Flores, R., 2001b. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest  
577 known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie*  
578 324, 943–952. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01370-1](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01370-1)

- 579 Flores, R., Delgado, S., Gas, M.-E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., De la Peña, M.,  
580 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication.  
581 FEBS Lett. 567, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.118>
- 582 Flores, R., Gago-Zachert, S., Serra, P., Sanjuán, R., Elena, S.F., 2014. Viroids: Survivors  
583 from the RNA World? *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 395–414.  
584 <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103416>
- 585 Flores, R., Grubb, D., Elleuch, A., Nohales, M.-Á., Delgado, S., Gago, S., 2011. Rolling-  
586 circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus:  
587 Variations on a theme. *RNA Biol.* 8, 200–206.  
588 <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14238>
- 589 Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.-A., Di Serio, F., 2005.  
590 Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 117–139.  
591 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- 592 Flores, R., Ruiz-Ruiz, S., Serra, P., 2012a. Viroids and Hepatitis Delta Virus. *Semin.*  
593 *Liver Dis.* 32, 201–210. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323624>
- 594 Flores, R., Serra, P., Minoia, S., Di Serio, F., Navarro, B., 2012b. Viroids: from genotype  
595 to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front.*  
596 *Microbiol.* 3, 217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00217>
- 597 Fox, A., Mumford, R.A., 2017. Plant viruses and viroids in the United Kingdom: An  
598 analysis of first detections and novel discoveries from 1980 to 2014. *Virus Res.*  
599 241, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.029>
- 600 Fraile, A., García-Arenal, F., 2018. Tobamoviruses as Models for the Study of Virus  
601 Evolution. *Adv. Virus Res.* 102, 89–117.  
602 <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.006>
- 603 François, S., Filloux, D., Fernandez, E., Ogliastro, M., Roumagnac, P., 2018. Viral  
604 Metagenomics Approaches for High-Resolution Screening of Multiplexed  
605 Arthropod and Plant Viral Communities, in: Pantaleo, V., Chiumenti, M. (Eds.),  
606 *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 77–95.  
607 [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_7)

- 608 Friday, D.R., 2017. Processing of Potato Spindle Tuber Viroids (PSTVd) RNAs in Yeast,  
609 a Nonconventional Host (Ph.D.). University of the Sciences in Philadelphia,  
610 United States -- Pennsylvania.
- 611 Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian  
612 mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.  
613 <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- 614 Gas, M.-E., Hernández, C., Flores, R., Daròs, J.-A., 2007. Processing of Nuclear Viroids  
615 In Vivo: An Interplay between RNA Conformations. *PLOS Pathog.* 3, e182.  
616 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030182>
- 617 Genus: Tobamovirus - Virgaviridae - Positive-sense RNA Viruses [WWW Document],  
618 n.d. . *Int. Comm. Taxon. Viruses ICTV*. URL [https://talk.ictvonline.org/ictv-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus)  
619 [reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus)  
620 [viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus) (accessed 11.11.20).
- 621 Gibbs, A., Armstrong, J., Mackenzie, A.M., Weiller, G.F., 1998. The GPRIME package:  
622 computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target  
623 in nucleic acid hybridisation-based diagnostic tests, and their use with plant  
624 viruses. *J. Virol. Methods* 74, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0166-](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00070-6)  
625 [0934\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00070-6)
- 626 Gilbert, W., 1986. Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.
- 627 Glouzon, J.-P., 2013. Étude de la dynamique des populations du viroïde de la  
628 mosaïque latente du pêcher par séquençage à haut débit et segmentation.
- 629 Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sängner, H.L., 1978.  
630 Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid.  
631 *Nature* 273, 203–208. <https://doi.org/10.1038/273203a0>
- 632 Gupta, A., Swati, D., 2017. Hammerhead Ribozymes in Archaeal Genomes: A  
633 Computational Hunt. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 9, 192–204.  
634 <https://doi.org/10.1007/s12539-016-0141-3>

- 635 Hadidi, A., 2019. Next-Generation Sequencing and CRISPR/Cas13 Editing in Viroid  
636 Research and Molecular Diagnostics. *Viruses* 11, 120.  
637 <https://doi.org/10.3390/v11020120>
- 638 Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., Barba, M., 2016. Next-Generation Sequencing and  
639 Genome Editing in Plant Virology. *Front. Microbiol.* 7, 1325.  
640 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>
- 641 Hamamoto, H., Watanabe, Y., Kamada, H., Okada, Y., 1997. Amino acid changes in  
642 the putative replicase of tomato mosaic tobamovirus that overcome resistance  
643 in Tm-1 tomato. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 2), 461–4. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-461>
- 645 Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D., 2002. Two classes of short  
646 interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671–4679.  
647 <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf464>
- 648 Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A Species of Small Antisense RNA in  
649 Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286, 950–952.  
650 <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- 651 Hammann, C., Steger, G., 2012. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.*  
652 9, 809–819.
- 653 Hammond, R.W., Owens, R.A., 2006. Viroids: New and Continuing Risks for  
654 Horticultural and Agricultural Crops. *APSnet Feature Artic.*  
655 <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>
- 656 Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed  
657 nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.  
658 *Nature* 404, 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- 659 Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., Akiba,  
660 M., 2013. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources  
661 in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7413–7418.  
662 <https://doi.org/10.1128/AEM.02354-13>

- 663 Hetzel, U., Szirovicza, L., Smura, T., Prähauser, B., Vapalahti, O., Kipar, A., Hepojoki,  
664 J., 2019. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *mBio* 10.  
665 <https://doi.org/10.1128/mBio.00014-19>
- 666 Hilf, M.E., Dawson, W.O., 1993. The Tobamovirus Capsid Protein Functions as a Host-  
667 Specific Determinant of Long-Distance Movement. *Virology* 193, 106–114.  
668 <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1107>
- 669 Hill, J.M., Zhao, Y., Bhattacharjee, S., Lukiw, W.J., 2014. miRNAs and viroids utilize  
670 common strategies in genetic signal transfer. *Front. Mol. Neurosci.* 7.  
671 <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00010>
- 672 Ishibashi, K., Ishikawa, M., 2016. Replication of Tobamovirus RNA. *Annu. Rev.*  
673 *Phytopathol.* 54, 55–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100217>
- 674 Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina,  
675 C., Nelson, R.S., Ding, B., 2007. A Structured Viroid RNA Serves as a Substrate  
676 for Dicer-Like Cleavage To Produce Biologically Active Small RNAs but Is  
677 Resistant to RNA-Induced Silencing Complex-Mediated Degradation. *J. Virol.*  
678 81, 2980–2994. <https://doi.org/10.1128/JVI.02339-06>
- 679 Ivanovsky, D., 1892. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St Petersburg*  
680 *Acad Imp Sci Bul* 35:60, 7.
- 681 Jacobi, V., 1991. Isolation of Tomato Mosaic Virus from Waters Draining Forest Stands  
682 in New York State. *Phytopathology* 81, 1112. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1112>
- 683 1112
- 684 Jd, C., Dk, L., Sm, T., So, R., Gd, B., R, J., J, C., Y, L., 1995. Detection of infectious tomato  
685 mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology* 85, 1409–1412.  
686 <https://doi.org/10.1094/phyto-85-1409>
- 687 Jezewska, M., Trzmiel, K., Zarzynska-Nowak, A., 2018. Detection of infectious  
688 tobamoviruses in irrigation and drainage canals in Greater Poland. *J. Plant Prot.*  
689 *Res.* 58. <https://doi.org/10.24425/119126>



- 690 Jiang, D., Wang, M., Li, S., 2017. Functional analysis of a viroid RNA motif mediating  
691 cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 98, 121–125.  
692 <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000630>
- 693 Jiang, J., Zhang, Z., Hu, B., Hu, G., Wang, H., Faure, C., Marais, A., Candresse, T., Li,  
694 S., 2017. Identification of a viroid-like RNA in a lychee Transcriptome Shotgun  
695 Assembly. *Virus Res.* 240, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.012>
- 696 Jiang, L., Wei, C., Li, Y., 2012. Viral suppression of RNA silencing. *Sci. China Life Sci.*  
697 55, 109–118. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4279-x>
- 698 Jiao, J., Kong, K., Han, J., Song, S., Bai, T., Song, C., Wang, M., Yan, Z., Zhang, H.,  
699 Zhang, R., Feng, J., Zheng, X., n.d. Field detection of multiple RNA  
700 viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant*  
701 *Biotechnol. J.* n/a. <https://doi.org/10.1111/pbi.13474>
- 702 Jimenez, R.M., Delwart, E., Lupták, A., 2011. Structure-based search reveals  
703 hammerhead ribozymes in the human microbiome. *J. Biol. Chem.* 286, 7737–  
704 7743. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.209288>
- 705 Kegler, H., Fuchs, E., Knapp, H.D., Ehrig, F., 1994. Untersuchungen zum vorkommen  
706 pflanzenpathogener viren im naturschutzgebiet insel vilm (Biosphärenreservat  
707 südost-rügen). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 29, 211–216.  
708 <https://doi.org/10.1080/03235409409383114>
- 709 Kim, J.-S., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., Kim, S.-Y., Ryu, C.-M., 2020. Crossing the kingdom  
710 border: Human diseases caused by plant pathogens. *Environ. Microbiol.* 22,  
711 2485–2495. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15028>
- 712 Kitajima, M., Sassi, H.P., Torrey, J.R., 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality  
713 indicator. *Npj Clean Water* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>
- 714 Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2013. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr.*  
715 *Opin. Virol.* 3, 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.008>
- 716 Kovalskaya, N., Hammond, R.W., 2014. Molecular biology of viroid–host interactions  
717 and disease control strategies. *Plant Sci., Disease resistance: molecular*

- 718 mechanisms and biotechnological applications 228, 48–60.  
719 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>
- 720 Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y., Watanabe, Y., 2007.  
721 Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J. Gen.*  
722 *Virool.* 88, 2347–2352. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82994-0>
- 723 Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., Leung, S.W.S., 2015. siRNA Versus miRNA as  
724 Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 4, e252.  
725 <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>
- 726 L'Anses lance l'alerte : quel est ce nouveau virus repéré en Bretagne et qui menace nos  
727 tomates ? [WWW Document], n.d. . LCI. URL [https://www.lci.fr/planete/l-](https://www.lci.fr/planete/l-anses-lance-l-alerte-quel-est-ce-nouveau-virus-tobrfv-repere-en-bretagne-et-qui-menace-nos-tomates-2144566.html)  
728 [anses-lance-l-alerte-quel-est-ce-nouveau-virus-tobrfv-repere-en-bretagne-et-](https://www.lci.fr/planete/l-anses-lance-l-alerte-quel-est-ce-nouveau-virus-tobrfv-repere-en-bretagne-et-qui-menace-nos-tomates-2144566.html)  
729 [qui-menace-nos-tomates-2144566.html](https://www.lci.fr/planete/l-anses-lance-l-alerte-quel-est-ce-nouveau-virus-tobrfv-repere-en-bretagne-et-qui-menace-nos-tomates-2144566.html) (accessed 9.26.20).
- 730 Lasda, E., Parker, R., 2014. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* 20,  
731 1829–1842. <https://doi.org/10.1261/rna.047126.114>
- 732 Latifi, A., Bernard, C., 2016. Replication of Avocado Sunblotch Viroid in the  
733 Cyanobacterium *Nostoc* Sp. PCC 7120. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07.  
734 <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000341>
- 735 Le mildiou de la pomme de terre - Maladies pomme de terre [WWW Document], n.d.  
736 URL  
737 [https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme\\_de\\_terre/maladies\\_de\\_la\\_pomm](https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme_de_terre/maladies_de_la_pomme_de_terre/mildiou_pomme_de_terre.html)  
738 [e\\_de\\_terre/mildiou\\_pomme\\_de\\_terre.html](https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme_de_terre/maladies_de_la_pomme_de_terre/mildiou_pomme_de_terre.html) (accessed 9.26.20).
- 739 Leone, M., Zavallo, D., Venturuzzi, A., Asurmendi, S., 2020. RdDM pathway is  
740 required for Tobamovirus-induced symptomatology production. *bioRxiv*  
741 2020.01.21.912923. <https://doi.org/10.1101/2020.01.21.912923>
- 742 Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by  
743 Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets.  
744 *Cell* 120, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>

- 745 Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B., 2003. Prediction  
746 of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 787–798.  
747 [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- 748 Li, R., Gao, S., Hernandez, A.G., Wechter, W.P., Fei, Z., Ling, K.-S., 2012. Deep  
749 Sequencing of Small RNAs in Tomato for Virus and Viroid Identification and  
750 Strain Differentiation. *PLoS ONE* 7, e37127.  
751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037127>
- 752 Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., Li, F., 2018. Detection of tobamoviruses  
753 by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *J. Virol. Methods* 259, 122–  
754 128. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012>
- 755 Lisón, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., Bellés, J.M.,  
756 Conejero, V., Rodrigo, I., 2013. A noncoding plant pathogen provokes both  
757 transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *PROTEOMICS*  
758 13, 833–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200286>
- 759 Liu, R., Vaishnav, R.A., Roberts, A.M., Friedland, R.P., 2013. Humans Have  
760 Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. *PLOS*  
761 *ONE* 8, e60621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060621>
- 762 López-Carrasco, A., Ballesteros, C., Sentandreu, V., Delgado, S., Gago-Zachert, S.,  
763 Flores, R., Sanjuán, R., 2017. Different rates of spontaneous mutation of  
764 chloroplastic and nuclear viroids as determined by high-fidelity ultra-deep  
765 sequencing. *PLOS Pathog.* 13, e1006547.  
766 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006547>
- 767 López-Carrasco, A., Flores, R., 2017. Dissecting the secondary structure of the circular  
768 RNA of a nuclear viroid *in vivo*: A “naked” rod-like conformation similar but  
769 not identical to that observed *in vitro*. *RNA Biol.* 14, 1046–1054.  
770 <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1223005>
- 771 Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam,  
772 Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O.,  
773 Dombrovsky, A., 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato

- 774 Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. PLOS ONE 12, e0170429.  
775 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- 776 Lwoff, A., 1957. The concept of virus. J. Gen. Microbiol. 17, 239–253.  
777 <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-239>
- 778 Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R.A., Sano, T., 2007. Successive  
779 accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle  
780 tuber viroid-infected tomato plants. J. Gen. Virol. 88, 3452–3457.  
781 <https://doi.org/10.1099/vir.0.83228-0>
- 782 Mackie, A.E., Barbetti, M.J., Rodoni, B., McKirdy, S.J., Jones, R.A.C., 2019. Effects of a  
783 Potato Spindle Tuber Viroid Tomato Strain on the Symptoms, Biomass, and  
784 Yields of Classical Indicator and Currently Grown Potato and Tomato  
785 Cultivars. Plant Dis. 103, 3009–3017. [https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0312-](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0312-RE)  
786 [RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0312-RE)
- 787 Magnius, L., Taylor, J., Mason, W.S., Sureau, C., Dény, P., Norder, H., ICTV Report  
788 Consortium, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus. J. Gen. Virol. 99,  
789 1565–1566. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001150>
- 790 Mak, J., 2005. RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive  
791 immunity. Retrovirology 2, 35. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-35>
- 792 Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W., Semancik, J.S., 2004. RNA silencing as related to  
793 viroid induced symptom expression. Arch. Virol. 149, 397–406.  
794 <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0215-5>
- 795 Marn, M.V., Pleško, I.M., 2012. First report of tomato apical stunt viroid in Solanum  
796 jasminoides in Slovenia. New Dis. Rep. 26.
- 797 Martick, M., Horan, L.H., Noller, H.F., Scott, W.G., 2008. A discontinuous  
798 hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. Nature  
799 454, 899–902. <https://doi.org/10.1038/nature07117>
- 800 Martín, R., Arenas, C., Daròs, J.-A., Covarrubias, A., Reyes, J.L., Chua, N.-H., 2007.  
801 Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVD)

- 802 in infected tomato plants. *Virology* 367, 135–146.  
803 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.011>
- 804 Martin, W.H., 1922. “Spindle tuber”, a new potato trouble. Spindle Tuber New Potato  
805 Trouble 3.
- 806 Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C., 2002. Two chloroplastic viroids  
807 induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional  
808 gene silencing. *J. Virol.* 76, 13094–13096. [https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13094-](https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13094-13096.2002)  
809 [13096.2002](https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13094-13096.2002)
- 810 Martínez, G., Castellano, M., Tortosa, M., Pallas, V., Gomez, G., 2014. A pathogenic  
811 non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal  
812 RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Res.* 42, 1553–1562.  
813 <https://doi.org/10.1093/nar/gkt968>
- 814 McNaughton, A.L., Roberts, H.E., Bonsall, D., de Cesare, M., Mokaya, J., Lumley, S.F.,  
815 Golubchik, T., Piazza, P., Martin, J.B., de Lara, C., Brown, A., Ansari, M.A.,  
816 Bowden, R., Barnes, E., Matthews, P.C., 2019. Illumina and Nanopore methods  
817 for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Sci. Rep.* 9, 7081.  
818 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43524-9>
- 819 Messmer, A., Sanderson, D., Braun, G., Serra, P., Flores, R., James, D., 2017. Molecular  
820 and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like  
821 RNA from ‘Pacific Gala’ apple ( *Malus domestica* ) in Canada. *Can. J. Plant*  
822 *Pathol.* 39, 342–353. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1354334>
- 823 Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J.C., Navarro, B., Flores,  
824 R., 2014. Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato  
825 spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J. Virol.* 88,  
826 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-14>
- 827 Mitchell, S.L., Simner, P.J., 2019. Next-Generation Sequencing in Clinical  
828 Microbiology: Are We There Yet? *Clin. Lab. Med.* 39, 405–418.  
829 <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.05.003>

- 830 Moelling, K., Broecker, F., 2019. Viruses and Evolution - Viruses First? A Personal  
831 Perspective. *Front. Microbiol.* 10, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00523>
- 832 Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, É., Lacomme, C., Burgyán, J., 2005. Plant  
833 Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly  
834 Structured Single-Stranded Viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812–7818.  
835 <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7812-7818.2005>
- 836 Moon, J., Jang, Y., Kim, N., Park, W.B., Park, K.-I., Lee, S.-T., Jung, K.-H., Kim, M., Lee,  
837 S.K., Chu, K., 2018. Diagnosis of Haemophilus influenzae Pneumonia by  
838 Nanopore 16S Amplicon Sequencing of Sputum. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1944–  
839 1946. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180234>
- 840 Moreno, M., Vázquez, L., López-Carrasco, A., Martín-Gago, J.A., Flores, R., Briones,  
841 C., 2019. Direct visualization of the native structure of viroid RNAs at single-  
842 molecule resolution by atomic force microscopy. *RNA Biol.* 1–14.  
843 <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572436>
- 844 n° 2020-SA-0038 Demande d'appui scientifique et technique sur les questions  
845 relatives aux mesures de prophylax.pdf, n.d.
- 846 Navarro, B., Di Serio, F., 2018. Double-Stranded RNA-Enriched Preparations to  
847 Identify Viroids by Next-Generation Sequencing, in: Pantaleo, V., Chiumenti,  
848 M. (Eds.), *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 37–43.  
849 [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_3)
- 850 Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.-E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F., 2012. Viroids:  
851 how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie*  
852 94, 1474–1480.
- 853 Olson, P., Lu, J., Zhang, H., Shai, A., Chun, M.G., Wang, Y., Libutti, S.K., Nakakura,  
854 E.K., Golub, T.R., Hanahan, D., 2009. MicroRNA dynamics in the stages of  
855 tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer. *Genes Dev.* 23,  
856 2152–2165. <https://doi.org/10.1101/gad.1820109>

- 857 Osborne, E.M., Schaak, J.E., Derose, V.J., 2005. Characterization of a native  
858 hammerhead ribozyme derived from schistosomes. *RNA N. Y. N* 11, 187–196.  
859 <https://doi.org/10.1261/rna.7950605>
- 860 Otulak, K., Garbaczewska, G., 2011. Cell-to-cell movement of three genera (+) ss RNA  
861 plant viruses. *Acta Physiol. Plant.* 33, 249–260. [https://doi.org/10.1007/s11738-](https://doi.org/10.1007/s11738-010-0538-2)  
862 010-0538-2
- 863 Owens, R.A., Hammond, R.W., 2009. Viroid Pathogenicity: One Process, Many Faces.  
864 *Viruses* 1, 298–316. <https://doi.org/10.3390/v1020298>
- 865 Panno, S., Caruso, A.G., Davino, S., 2019. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit  
866 Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Dis.* 103, 1443–1443.  
867 <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- 868 Paraskevopoulou, S., Pirzer, F., Goldmann, N., Schmid, J., Corman, V.M., Gottula,  
869 L.T., Schroeder, S., Rasche, A., Muth, D., Drexler, J.F., Heni, A.C., Eibner, G.J.,  
870 Page, R.A., Jones, T.C., Müller, M.A., Sommer, S., Glebe, D., Drosten, C., 2020.  
871 Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical  
872 rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
873 <https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>
- 874 Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N.,  
875 Ravnikar, M., 2017. Next Generation Sequencing for Detection and Discovery  
876 of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front.*  
877 *Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- 878 Petit, P.R., Borentain, P., Aherfi, S., Gérolami, R., Colson, P., 2020. Hepatitis Delta  
879 recurrence post-liver transplantation in absence of detectable hepatitis B  
880 surface antigen and hepatitis B virus DNA in peripheral blood. *Clin. Res.*  
881 *Hepatol. Gastroenterol.* 44, e41–e44. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.11.007>
- 882 Piernikarczyk, R.J.J., 2016. Viroid evolution and viroid-induced pathogenesis  
883 networks in host plants. *Universitäts-und Landesbibliothek der Heinrich-*  
884 *Heine-Universität Düsseldorf.*

- 885 Principe de virologie végétale ; génome, pouvoir pathogène, écologie des virus - S  
886 Astier, J Albouy, Y Maury, H Lecoq - Quae - Grand format - Les mots & les  
887 choses BOULOGNE BILLANCOURT, n.d.
- 888 protocole\_virus\_contact\_tomate\_2019\_Chambre d'agriculture\_APREL\_v3.pdf, n.d.
- 889 Quick, J., Grubaugh, N.D., Pullan, S.T., Claro, I.M., Smith, A.D., Gangavarapu, K.,  
890 Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T.F., Beutler, N.A., Burton, D.R.,  
891 Lewis-Ximenez, L.L., de Jesus, J.G., Giovanetti, M., Hill, S.C., Black, A.,  
892 Bedford, T., Carroll, M.W., Nunes, M., Alcantara, L.C., Sabino, E.C., Baylis,  
893 S.A., Faria, N.R., Loose, M., Simpson, J.T., Pybus, O.G., Andersen, K.G., Loman,  
894 N.J., 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika  
895 and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* 12, 1261–  
896 1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>
- 897 Raoult, D., Forterre, P., 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat. Rev.*  
898 *Microbiol.* 6, 315. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1858>
- 899 Ressources génétiques - Revues du Cirad TOBAMOVIRUS Tm2 et Tm-22 genes de  
900 resistance.pdf, n.d.
- 901 Riccitelli, N.J., Delwart, E., Lupták, A., 2014. Identification of minimal HDV-like  
902 ribozymes with unique divalent metal ion dependence in the human  
903 microbiome. *Biochemistry* 53, 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/bi401717w>
- 904 Rizzetto, M., Canese, M.G., Aricò, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., Verme, G.,  
905 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system  
906 (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg  
907 carriers. *Gut* 18, 997–1003. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>
- 908 Rizzetto, M., Stroffolini, T., 2021. Forty-Five Years after the Discovery of the Hepatitis  
909 D Virus: Where Do We Stand? *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13040555>
- 910 Robertson, H.D., 1996. How Did Replicating and Coding RNAs First Get Together?  
911 *Science* 274, 66–67. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.66>



- 912 Roger, R., 2011. Les viroïdes. *frontierebiologie*. URL  
913 <https://frontierebiologie.wordpress.com/article/les-viroides-3vj6j5b5omxnq-2/>  
914 (accessed 9.26.20).
- 915 Rojas, A.A., Vazquez-Tello, A., Ferbeyre, G., Venanzetti, F., Bachmann, L., Paquin, B.,  
916 Sbordoni, V., Cedergren, R., 2000. Hammerhead-mediated processing of  
917 satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic*  
918 *Acids Res.* 28, 4037–4043. <https://doi.org/10.1093/nar/28.20.4037>
- 919 Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J., Breitbart, M., 2009. Pepper  
920 Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*  
921 75, 7261–7267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00410-09>
- 922 Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A., Szostak, J.W., 2006. A genomewide  
923 search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene.  
924 *Science* 313, 1788–1792. <https://doi.org/10.1126/science.1129308>
- 925 Sanger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., Kleinschmidt, A.K., 1976. Viroids are  
926 single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly  
927 base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 3852–3856.  
928 <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3852>
- 929 Seehafer, C., Kalweit, A., Steger, G., Gräf, S., Hammann, C., 2011. From alpaca to  
930 zebrafish: Hammerhead ribozymes wherever you look. *RNA* 17, 21–26.  
931 <https://doi.org/10.1261/rna.2429911>
- 932 Seligmann, H., Raoult, D., 2018. Stem-Loop RNA Hairpins in Giant Viruses: Invading  
933 rRNA-Like Repeats and a Template Free RNA. *Front. Microbiol.* 9.  
934 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00101>
- 935 Seligmann, H., Raoult, D., 2016. Unifying view of stem-loop hairpin RNA as origin of  
936 current and ancient parasitic and non-parasitic RNAs, including in giant  
937 viruses. *Curr. Opin. Microbiol., Environmental microbiology \* Special Section:*  
938 *Megaviromes* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.004>
- 939 Sheshukova, E., Ershova, N., Kamarova, K., Dorokhov, Y., Komarova, T., 2020. The  
940 Tobamoviral Movement Protein: A “Conditioner” to Create a Favorable

- 941 Environment for Intercellular Spread of Infection. *Front. Plant Sci.* 11, 959.  
942 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00959>
- 943 Sidharthan, V.K., Sevanthi, A.M., Jaiswal, S., Baranwal, V.K., 2020. Robust Virome  
944 Profiling and Whole Genome Reconstruction of Viruses and Viroids Enabled  
945 by Use of Available mRNA and sRNA-Seq Datasets in Grapevine (*Vitis vinifera*  
946 L.). *Front. Microbiol.* 11, 1232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01232>
- 947 Smith, E., Dombrovsky, A., 2019. Aspects in *Tobamovirus* Management in  
948 Intensive Agriculture. *Plant Dis.-Curr. Threats Manag. Trends.*  
949 <https://doi.org/10.5772/intechopen.87101>
- 950 Smith, R.L., Lawrence, J., Shukla, M., Singh, M., Li, X., Xu, H., Gardner, K., Nie, X.,  
951 2018. First Report of *Coleus blumei* viroid 5 and Molecular Confirmation of  
952 *Coleus blumei* viroid 1 in Commercial *Coleus blumei* in Canada. *Plant Dis.* 102,  
953 1862–1862. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0055-PDN>
- 954 Sogo, J.M., Koller, Th., Diener, T.O., 1973. Potato spindle tuber viroid: X. visualization  
955 and size determination by electron microscopy. *Virology* 55, 70–80.  
956 [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(73\)81009-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(73)81009-8)
- 957 St-Pierre, P., Hassen, I.F., Thompson, D., Perreault, J.P., 2009. Characterization of the  
958 siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383, 178–  
959 182. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.008>
- 960 Symons, R.H., Randles, J.W., 1999. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs  
961 (virusoids) of plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 239, 81–105.  
962 [https://doi.org/10.1007/978-3-662-09796-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-09796-0_5)
- 963 Szirovicza, L., Hetzel, U., Kipar, A., Martinez-Sobrido, L., Vapalahti, O., Hepojoki, J.,  
964 2020. Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To  
965 Generate Infectious Particles. *mBio* 11, e03250-19, /mbio/11/2/mBio.03250-  
966 19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.03250-19>
- 967 Tangkanchanapas, P., Haegeman, A., Ruttink, T., Höfte, M., De Jonghe, K., 2020.  
968 Whole-Genome Deep Sequencing Reveals Host-Driven in-planta Evolution of

- 969 Columnea Latent Viroid (CLVd) Quasi-Species Populations. *Int. J. Mol. Sci.* 21.  
970 <https://doi.org/10.3390/ijms21093262>
- 971 Taylor, J., Pelchat, M., 2010. Origin of hepatitis  $\delta$  virus. *Future Microbiol.* 5, 393–402.  
972 <https://doi.org/10.2217/fmb.10.15>
- 973 te Velthuis, A.J.W., Long, J.C., Bauer, D.L.V., Fan, R.L.Y., Yen, H.-L., Sharps, J., Siegers,  
974 J.Y., Killip, M.J., French, H., Oliva-Martín, M.J., Randall, R.E., de Wit, E., van  
975 Riel, D., Poon, L.L.M., Fodor, E., 2018. Mini viral RNAs act as innate immune  
976 agonists during influenza virus infection. *Nat. Microbiol.* 3, 1234–1242.  
977 <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0240-5>
- 978 Teixeira, A., Tahiri-Alaoui, A., West, S., Thomas, B., Ramadass, A., Martianov, I., Dye,  
979 M., James, W., Proudfoot, N.J., Akoulitchev, A., 2004. Autocatalytic RNA  
980 cleavage in the human beta-globin pre-mRNA promotes transcription  
981 termination. *Nature* 432, 526–530. <https://doi.org/10.1038/nature03032>
- 982 The Ribosome Is a Ribozyme | Science [WWW Document], n.d. URL  
983 <https://science.sciencemag.org/content/289/5481/878.full> (accessed 5.2.21).
- 984 ToBRFV-QA.pdf, n.d.
- 985 Tseng, C.-H., Lai, M.M.C., 2009. Hepatitis Delta Virus RNA Replication. *Viruses* 1,  
986 818–831. <https://doi.org/10.3390/v1030818>
- 987 Vance, V., Vaucheret, H., 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense.  
988 *Science* 292, 2277–2280. <https://doi.org/10.1126/science.1061334>
- 989 Verdin, E., Gentit, P., Steyer, S., Wetzels, T., Le Bourgeois, T., Balesdent, M.-H., Binet,  
990 F., Biondi, A., Castagnone, P., Deberdt, P., Desneux, N., Desprez Loustau, M.-  
991 L., Escobar Gutiérrez, A., Gentsbittel, L., Jactel, H., Makowski, D., Monty, A.,  
992 Navajas, M., Nesme, X., Robin, M.-H., Verheggen, F., Tayeh, C., 2020.  
993 Évaluation du risque simplifiée du tomato brown rugose fruit virus pour la  
994 France métropolitaine. Anses éditions.
- 995 Verdin, E., Wipf-Scheibel, C., Gognalons, P., Aller, F., Jacquemond, M., Tepfer, M.,  
996 2017. Sequencing viral siRNAs to identify previously undescribed viruses and

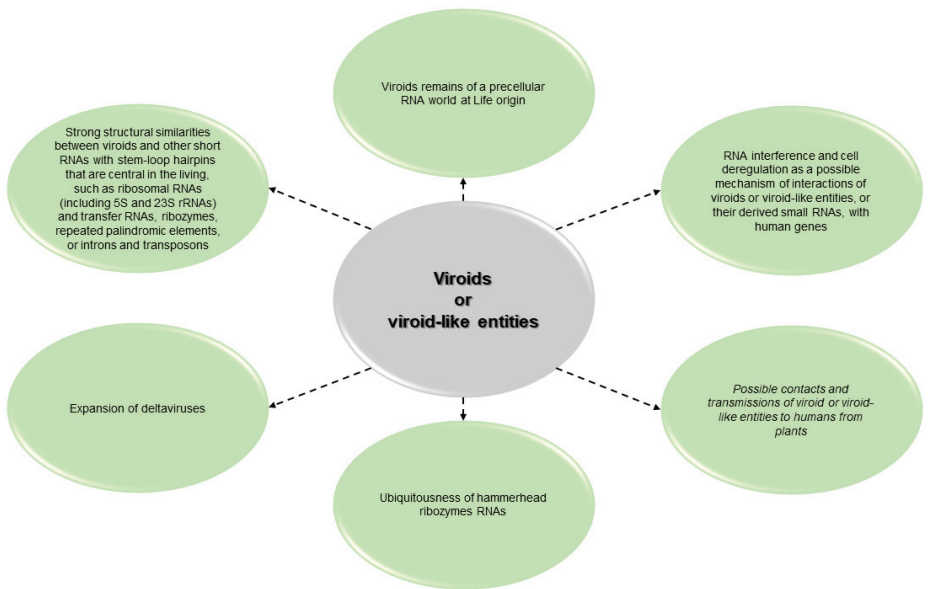
- 997 viroids in a panel of ornamental plant samples structured as a matrix of pools.  
998 Virus Res. 241, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.019>
- 999 Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., 2006. First Report of Tomato apical  
1000 stunt viroid in Tomato in Tunisia. Plant Dis. 90, 528–528.  
1001 <https://doi.org/10.1094/PD-90-0528A>
- 1002 Verhoeven, J.T.J., Koenraad, H.M.S., Westenberg, M., Roenhorst, J.W., 2017a.  
1003 Characterization of tomato apical stunt viroid isolated from a 24-year old seed  
1004 lot of *Capsicum annuum*. Arch. Virol. 162, 1741–1744.  
1005 <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3277-5>
- 1006 Verhoeven, J.T.J., Koenraad, H.M.S., Westenberg, M., Roenhorst, J.W., 2017b.  
1007 Characterization of tomato apical stunt viroid isolated from a 24-year old seed  
1008 lot of *Capsicum annuum*. Arch. Virol. 162, 1741–1744.  
1009 <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3277-5>
- 1010 Verhoeven, J. th j, Jansen, C.C.C., Willems, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst,  
1011 J.W., 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea  
1012 latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid.  
1013 Eur. J. Plant Pathol. 110, 823–831. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2493-5>
- 1014 Virus des solanacées : du génome viral é la protection des cultures MARCHOUX  
1015 Georges, GOGNALONS Patrick [WWW Document], n.d. . Libr. Lavoisier. URL  
1016 [https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/virus-des-solanacees-du-genome-](https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/virus-des-solanacees-du-genome-viral-e-la-protection-des-cultures/marchoux/descriptif_2149402)  
1017 [viral-e-la-protection-des-cultures/marchoux/descriptif\\_2149402](https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/virus-des-solanacees-du-genome-viral-e-la-protection-des-cultures/marchoux/descriptif_2149402) (accessed  
1018 4.4.21).
- 1019 Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,  
1020 1995. . Arch. Virol. Suppl. 10, 1–586.
- 1021 Vogt, U., Pélissier, T., Pütz, A., Razvi, F., Fischer, R., Wassenegger, M., 2004. Viroid-  
1022 induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce  
1023 extensive spreading of methylation or transitive silencing. Plant J. 38, 107–118.  
1024 <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02029.x>

- 1025 Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.-M.,  
1026 Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse,  
1027 P.M., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of  
1028 viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3275–3280.  
1029 <https://doi.org/10.1073/pnas.0400104101>
- 1030 Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R.A., Sano, T.,  
1031 2011. Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is  
1032 accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars.  
1033 *Virology* 413, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.021>
- 1034 Webster, C.G., Rosskopf, E.N., Lucas, L., Mellinger, H.C., Adkins, S., 2014. First Report  
1035 of Tomato mottle mosaic virus Infecting Tomato in the United States. *Plant*  
1036 *Health Prog.* 15, 151–152. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0023>
- 1037 Wieczorek, P., Obrępańska-Stęplowska, A., 2015. Suppress to Survive—Implication of  
1038 Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol. Biol. Report. Ispmb* 33, 335–346.  
1039 <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0755-8>
- 1040 Wille, M., Netter, H.J., Littlejohn, M., Yuen, L., Shi, M., Eden, J.-S., Klaassen, M.,  
1041 Holmes, E.C., Hurt, A.C., 2018. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds.  
1042 *Viruses* 10, 720. <https://doi.org/10.3390/v10120720>
- 1043 Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., Breaker, R.R., 2004. Control of gene  
1044 expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428, 281–286.  
1045 <https://doi.org/10.1038/nature02362>
- 1046 Yanagisawa, H., Sano, T., Hase, S., Matsushita, Y., 2019. Influence of the terminal left  
1047 domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid  
1048 and potato spindle tuber viroid through pollen. *Virology* 526, 22–31.  
1049 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.021>
- 1050 Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai,  
1051 X., 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1:  
1052 evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 22, 107.

- 1053 Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.-Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L.,  
1054 Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y., 2006. RNA viral community in human feces:  
1055 prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4, e3.  
1056 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>
- 1057 Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J., 2018. Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and  
1058 Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38,  
1059 133–140. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0547-4>
- 1060 Zhao, Y., Cong, L., Lukiw, W.J., 2017. Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and  
1061 Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell. Mol. Neurobiol.*  
1062 <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0547-4>
- 1063 Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., Li, M.M., 2021. Application of Next Generation  
1064 Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann. Lab. Med.* 41, 25–43.  
1065 <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>  
1066

FIGURE LEGEND

**Figure 1.** Main features of viroids or viroid-like entities that support their presence or interaction in humans.



# PROJET II





# Recherche *in silico* de séquences viroïde- like chez l'homme



## *Avant-propos*

Dans la revue présentée dans ce manuscrit, nous avons argumenté sur une relation possible entre les ARN de type viroïde et le monde animal (Bengone-Abogourin et al., 2021). De plus, à partir de ce qui a été reporté dans la littérature des ressemblances structurales et fonctionnelles sont existantes entre les viroïdes et les microRNA (miRNA) de plantes et de mammifères : des ressemblances structurales incluant la conformation en épingle à cheveux et des ressemblances fonctionnelles comme le mécanisme d'ARN inférence (ARNi) conservé dans quasiment tous les règnes (Molnár et al., 2005) incluant les bactéries (Hamilton et al., 2002), les insectes (Hammond et al., 2000), les protozoaires (Hamilton and Baulcombe, 1999), les champignons (Molnár et al., 2005), les plantes et les vertébrés (Friedman et al., 2009; Molnár et al., 2005).

Les plantes ne disposent pas de système immunitaire de même nature que celui des vertébrés pour se défendre contre les microorganismes (Mak, 2005). En revanche, elles ont un système de défense impliquant un mécanisme de reconnaissance par ARN interférence impliquant le clivage des acides ribonucléiques pathogènes. Ce processus de gene silencing est décrit en particulier lors d'infections virales (cf. paragraphe ci-dessus "Présentation des viroïdes"). Une petite région appelée « seed » située au niveau des extrémités des miRNAs du génome des viroïdes est particulièrement impliqué dans ce processus. On retrouve cette région « seed » au niveau des domaines 3' (Friedman et al., 2009) et 5' (Lewis et al., 2003) des extrémités non traduites (untranslated region, UTR). Elle est conservée chez les miRNAs de mammifères et joue un rôle actif dans l'interférence par ARN (Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005, 2003). La région « seed » comprend un motif de 6, 7 ou 8 nucléotides de long qui est essentiel pour permettre un appariement précis avec les ARNs messagers (ARNm) de vertébrés (Figure 15)

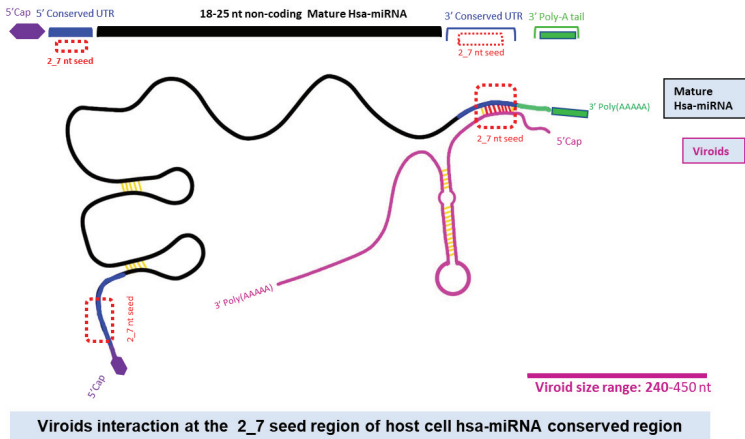


Figure 15: Représentation de l'interaction de l'appariement des viroïdes à la région « seed » retrouvé au niveau des domaines 3' et 5' des miRNAs humains (hsa-miRNAs) de la cellule hôte

Dans le projet II, une approche *in silico* a été conduite pour rechercher des correspondances entre les viroïdes et les microRNAs humains.

Mots clés : Viroïdes, miRNA Humains, plantes



## Article bio-informatique

# Cross-kingdom sequence similarities between human microRNAs and viroids

*Bengone-Abogourin JG, Chelkha N, Verdin E, Colson P.*

2020





Article publié dans *Intervirolgy*



Adobe Acrobat  
PDFXML Document



Brief Report

Intervirology

Intervirology  
DOI: 10.1159/000509212

Received: February 1, 2020  
Accepted: June 6, 2020  
Published online: July 8, 2020

## Sequence Similarities between Viroids and Human MicroRNAs

Jessica Grace Bengone-Abogourin<sup>a</sup> Nisrine Chelkha<sup>a</sup> Eric Verdin<sup>c</sup>  
Philippe Colson<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Aix-Marseille University, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Microbes Evolution Phylogeny and Infections (MEPHI), Marseille, France; <sup>b</sup>IHU Méditerranée Infection, Marseille, France; <sup>c</sup>INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, Montfavet, France

### Keywords

Viroid · microRNA · RNA interference · Human · Plants · Messenger RNA

### Abstract

Viroids are minute unencapsidated non-coding circular RNAs known to be present and to cause diseases only in plants. Infections were associated with the occurrence of specific single-stranded RNAs similar in size to miRNAs and endogenous small interfering RNAs, and viroid pathogenicity is suspected to occur through RNA interference. We looked for sequence similarities between viroids and the seed region of human microRNAs (hsa-miRNAs). Viroid genomes were retrieved from GenBank and mature hsa-miRNAs were retrieved from miRBase. Two hundred 300-nucleotide-long sequences were randomly generated as controls. BLAST searches were performed using viroids as queries and hsa-miRNAs as subjects with relaxed parameters, and matches involving hsa-miRNA seed regions were considered. A total of 81,021 matches were found, and 1,501 that showed 100% identity with whole hsa-miRNA seed regions were selected. The most frequent matches involved *Chrysanthemum stunt viroid* or *Hop stunt viroid* species with hsa-miR-4286, in 365 and 207 cases, respectively. Three hsa-mi-

RNAs (miR-4286, miR-6808-5p, and miR-3622a-3p) were involved in 47% of all matches between viroids and hsa-miRNAs. Taken together, these findings warrant further investigation on the potential of viroids and their derived small RNAs to cross kingdoms and interact with nucleic acids in humans.

© 2020 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Very few connections have been made between vegetal and animal pathogens, which are studied by distinct researchers [1]. Thus, viroids are very particular entities that are pathogenic for crop plants and have only been studied in plants [2, 3]. They are minute (246–401 nucleotides [nt] long) unencapsidated non-coding circular RNAs endowed with autonomous replication [3, 4]. They are highly stable due to high levels of intrasequence complementarities [5]. The mechanisms by which viroids cause diseases in plants are suspected to involve RNA interference, and RNA interference machineries from host cells [6, 7]. Several structural and functional similarities have been highlighted between viroids and pre-miRNAs (pre-miRNAs), which are hairpin-shaped stem-

KARGER

© 2020 S. Karger AG, Basel

karger@karger.com  
www.karger.com/mt

Philippe Colson  
Virology, MEPHI  
IHU Méditerranée Infection  
19-21 Boulevard Jean Moulin, FR-13005 Marseille (France)  
philippe.colson@univ-amu.fr

0000-0001-9000-0000

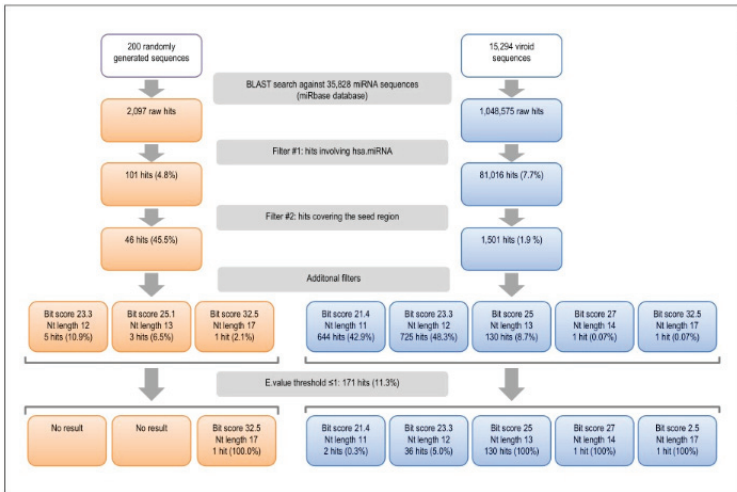


Fig. 1. Flowchart of the BLAST searches and matches for miRNA against all generated random sequences and all the viroid sequences.

loop double-stranded RNA precursors of miRNA [8]. This is for instance the case between *Potato spindle tuber viroid* and human pre-miRNA-146a. In their mature form, miRNAs are non-coding regulatory sequences that are small, 18–25 nt in size, and interfere with host target genes in cells from plants, insects, nematodes, and vertebrates, including humans [9, 10]. A nucleotide motif located at miRNA positions 2–7 or 8, called the “seed region,” plays an active role in this RNA interference [11]. It is complementary to the 3′- or 5′- untranslated regions (UTR) that are conserved regions of host messenger RNAs (mRNAs) [10, 12]. It was shown that a perfect complementarity between this seed region and its target can induce RNA silencing in mammals [13]. Moreover, miRNA seed-matching regions have been described as being conserved in multiple mRNAs from mammals, including humans [10, 14]. Here, we sought similarities between viroids and the seed region of mature human (hsa, for *Homo sapiens*) miRNAs.

### Materials and Methods

We first retrieved all viroid genomes available from the NCBI GenBank nucleotide sequence database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and all available mature miRNA sequences from the miRBase database ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) [15]. In addition, through the RAND-NA tool [16], we generated 200 random sequences with a size of 300 nt, similar to that of viroids, to use as controls. They consisted of 5 groups of 40 sequences with a G+C content of 40, 45, 50, 55, and 60%, chosen to cover the range of G+C-contents found in viroids. We performed BLAST searches using viroid sequences as queries and all mature miRNA sequences as subjects, with relaxed parameters including 4 as word size, 1,000 as e-value threshold, and no filter. The ten best BLAST results were thereafter filtered by keeping only viroids matching with mature hsa-miRNAs. The same protocol was used by handling the random sequences. BLAST results were sorted based primarily on a match involving the seed region of hsa-miRNAs (2–7 nt), as well as thresholds for the BLAST scores, the length of the sequence alignments, the percentage of identity between viroids and mature hsa-miRNAs, and the e-value (Fig. 1). Finally, information on hsa-miRNAs whose seed region matched with viroid RNAs according to our criteria were searched for through the miRBase database and the NCBI PubMed database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

**Table 1.** Top 31 most frequent matches (with a frequency  $\geq 5$ ) between viroids and seed regions of hsa-miRNAs

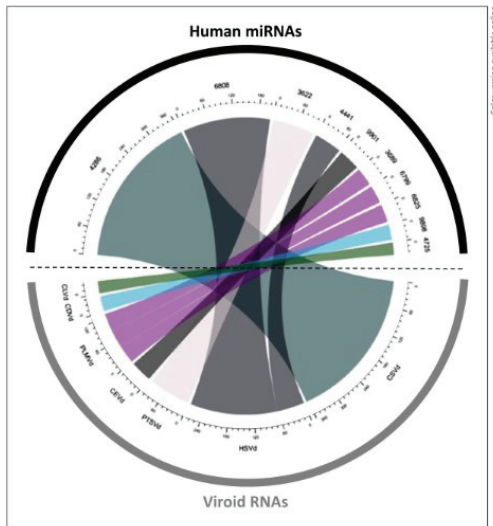
No.	Acronyms	Viroid species	hsa-miRNA	Frequency
1.	CSVd	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	hsa-miR-4286	365
2.	HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>	hsa-miR-6808-5p	207
3.	PTSVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	hsa-miR-3622a-3p	102
4.	HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>	hsa-miR-4441	65
5.	CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>	hsa-miR-9901	51
6.	PLMVd	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	hsa-miR-3689d	43
7.	PLMVd	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	hsa-miR-6799-5p	43
8.	PLMVd	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	hsa-miR-6825-5p	43
9.	CDVd	<i>Citrus dwarfing viroid</i>	hsa-miR-9898	37
10.	CLVd	<i>Columnnea latent viroid</i>	hsa-miR-4725-5p	30
11.	HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>	hsa-miR-1207-5p	26
12.	HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>	hsa-miR-4756-5p	26
13.	PCFVd	<i>Pepper chat fruit viroid</i>	hsa-miR-4740-3p	26
14.	PCFVd	<i>Pepper chat fruit viroid</i>	hsa-miR-6836-3p	25
15.	ADFVd	<i>Apple dimple fruit viroid</i>	hsa-miR-9898	22
16.	CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>	hsa-miR-8072	17
17.	CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>	hsa-miR-4649-3p	16
18.	ASSVd	<i>Apple scar skin viroid</i>	hsa-miR-6775-3p	10
19.	GYSVd	<i>Grapevine yellow speckle viroid</i>	hsa-miR-1253	9
20.	GYSVd	<i>Grapevine yellow speckle viroid</i>	hsa-miR-6878-3p	9
21.	ELVd	<i>Eggplant latent viroid</i>	hsa-miR-514b-3p	8
22.	PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	hsa-miR-3074-5p	8
23.	CDVd	<i>Citrus dwarfing viroid</i>	hsa-miR-6758-5p	7
24.	CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>	hsa-miR-6787-3p	7
25.	CBVd	<i>Coleus blumei viroid</i>	hsa-miR-191-5p	7
26.	MPVd	<i>Mexican papita viroid</i>	hsa-miR-3622a-3p	7
27.	PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	hsa-miR-4291	7
28.	PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	hsa-miR-4649-5p	7
29.	HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>	hsa-miR-6876-5p	6
30.	TMCVd	<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	hsa-miR-3622a-3p	6
31.	PCFVd	<i>Pepper chat fruit viroid</i>	hsa-miR-3682-5p	5

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Nucleotide diversity at viroid regions matching with mature hsa-miRNA seed regions was represented using the WebLogo online tool version 2.8.2 [17]. Statistical analyses were performed with Openepi software (v.3.03a; <http://www.openepi.com>). Proportions were compared using  $\chi^2$  or Fisher tests.  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

A total of 15,294 viroid sequences were used as queries for BLAST searches against a database of 35,828 mature miRNAs. This generated 1,048,575 hits (Fig. 1). Of them, 81,021 (7.7%) corresponded to matches between viroids and hsa-miRNA seed regions. After considering cases where viroid fragments were 100% similar to the whole hsa-miRNA seed region from its start (position 1 or 2), 1,501 hits (1.9%; 0.14% of the total number of hits) remained (online suppl. Table S1; for all online suppl.

material, see [www.karger.com/doi/10.1159/000509212](http://www.karger.com/doi/10.1159/000509212)). BLAST results were found to have an  $e$  value  $< 1$  in 170 (11.3%) cases. Among these 1,501 hits, 644, 725, 130, 1, and 1 had a nucleotide alignment length of 11, 12, 13, 14, and 17 nt, respectively. The longest match (17 nt) involved *Potato spindle tuber viroid* strain DI285387\_1\_KR\_1020130054489-A/33666 and hsa-miRNA-6774-5p, with a BLAST bit score of 32.5. The second longest match (14 nt) was between *Potato spindle tuber viroid* strain A/2147 and hsa-miRNA-3145-5p (BLAST bit score of 27). After removing duplicates, 25 different viroid species were involved in matches with the seed region of 212 different hsa-miRNAs (Table 1). A same procedure was applied to the 200 random sequences of 300 nt used as controls for specificity assessment. BLAST searches using these sequences against the miRNA database generated 2,097 hits. Out of them, 101 (4.8%) involved the whole seed region of several hsa-miRNAs with an identity of 100%. Among



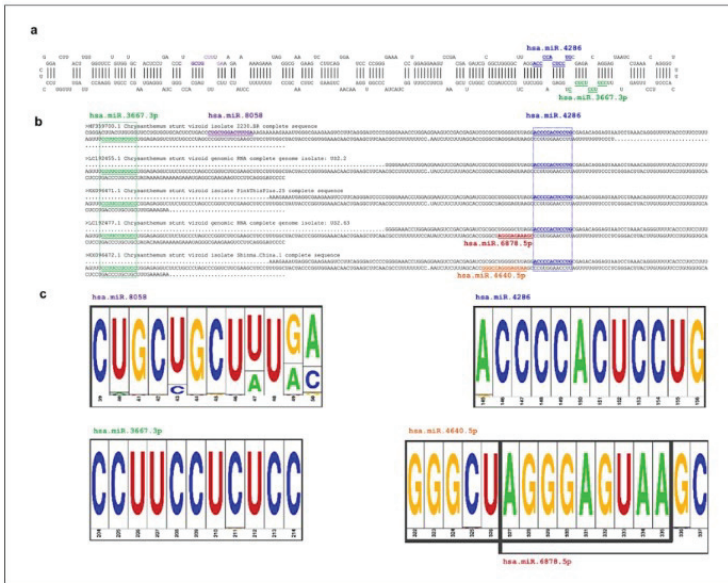
**Fig. 2.** Chord diagram representing the frequency of matches between the 10 viroid species and hsa mature-miRNAs the most frequently involved in matches. Numbers on the inner circle indicate numbers of interactions between viroids and hsa-miRNAs.

these 101 hits, 5, 3, and 1 had a nucleotide alignment length of 12, 13, and 17 nt, respectively. Hence, the proportion of these hits with an alignment length  $\geq 12$  nt was higher for viroids than for controls (57 vs. 20%;  $p < 1e-3$ ).

Overall, the most frequent matches involved *Chrysanthemum stunt viroid* or *Hop stunt viroid* species (online suppl. Fig. S1) with hsa-miR-4286, in 365 and 207 cases, respectively (Table 1). *Potato spindle tuber viroid* species matched 102 times with hsa-miR 3622. Nineteen of the 25 species of viroids for which fragments were found to match significantly with the seed region of hsa-miRNAs are known to infect fruits or vegetables that are common in human food, which suggests that humans can be exposed to them (online suppl. Table S2). The other viroids have been described to infect flowers, which may also allow contacts with humans. The 10 viroid species most frequently involved in the 1,501 significant matches with seed regions of hsa-miRNAs were implicated in almost all matches, and 5 of them – *Chrysanthemum stunt viroid*,

*Hop stunt viroid*, *Potato spindle tuber viroid*, *Peach latent mosaic viroid*, and *Citrus exocortis viroid* – represented 83% of all matches (online Suppl. Fig. S1). Moreover, matches between 7 different viroid species and 10 hsa-miRNAs represented 66% of all matches (Fig. 2).

Thirteen hsa-miRNAs were found to match with >1 viroid species (online Suppl. Table S3). The 10 hsa-miRNAs whose seed regions most frequently matched with viroids were involved in 69% of all matches (online suppl. Fig. S2). Three hsa-miRNAs – miR-4286, miR-6808-5p, and miR-3622a-3p – were involved in almost half (47%) of all matches. MiR-4286 upregulation was reported in various types of malignancies, including pancreatic cancer, glioma, esophageal adenocarcinoma, and melanoma [18, 19]. MiR-6808 has been described as part of human splicing-derived miRNAs (“mirtrons”) and was notably found to target the DVL1 gene, the dysregulation of which is associated with the progression of numerous cancers [20, 21]. MiR-3622a-3p has been identified as significant-



**Fig. 3.** Conservation in the genomes from different isolates of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* species of the regions that matched with the seed regions of hsa-miRNAs. Conservation in the genomes from different isolates of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* species of the regions that matched with the seed regions of hsa-miRNAs were represented on a viroid circularized genome (**a**, **d**), on alignments of 5 viroid sequences (**b**, **e**), and as sequence logos showing the consensus sequences corresponding only to viroid re-

gions matching hsa-miRNA seed regions (**c**, **f**). These sequence logos were built using the WebLogo online tool version 2.8.2 [17], with 91 *Chrysanthemum stunt viroid* sequences and 341 *Potato spindle tuber viroid* sequences that were downloaded from the NCBI GenBank nucleotide sequence database using viroid names and "complete" and "genome" as search terms, and that were directly alignable on their full length (see also online suppl. Fig. S3, S4 showing sequence logos for full-length viroids, and online suppl. Materials with viroid full-length sequence alignments).

(Figure continued on next page.)

ly expressed in patients suffering from bladder urothelial carcinoma and associated with longer survival times [22]. In addition, miR-4441, the fourth miRNA whose seed region most frequently matched with viroids, targets the human histone deacetylase 4 (HDAC4) gene that affects transcriptional regulation, cell cycle progression, and developmental events by altering or repressing access to tar-

get DNA promoters [23]. Finally, we analyzed the conservation of the regions that perfectly matched with the seed regions of hsa-miRNAs in the genomes of various viroid isolates from 2 species. We observed that these regions were either conserved or varied between viroid isolates in the genomes from *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* (Fig. 3).





## Discussion

Here, we describe for the first time 100% identity between several viroid fragments and the seed region that acts in the RNA interference process of various human miRNAs. Previously, cross-kingdom similarities were also noted between human miRNAs and plant virus genomes [12]. Virus-encoded microRNAs have been described or hypothesized to interact with host mRNAs [24, 25]. For instance, human cytomegalovirus-encoded miR-UL112 was found to downregulate the major histocompatibility complex class I-related chain B gene expression during viral infection [24]. More recently, SARS-CoV-encoded small RNAs were suspected to contribute to the lung pathology associated with viral infection [26]. Viroids have stem-loop-like conformations as pri- and pre-miRNAs, the miRNA precursors [3, 5]. Viroids and pri- and pre-miRNAs are both RNA unencapsidated enti-

ties with non-coding properties that involve ribonuclease and dicer complexes to produce small RNA units [27, 28]. As a matter of fact, viroid infection was recently associated with the appearance of specific single-stranded RNA, the size of which is similar to that of miRNAs and endogenous small interfering RNAs [7, 29]. Thus, viroid-specific small RNAs comprised by 21–24 nt were detected by Northern blots in infected plants for *Potato spindle tuber viroid* [28, 30], *Citrus exocortis viroid* [31], and *Peach latent mosaic viroid* [32], while *Potato spindle tuber viroid* RNA was deemed to be opportunistic and suspected as capable of using different processing pathways in different hosts [33].

Viroids were not detected previously in humans but they could have been missed. Interestingly, although viroids were deemed to only replicate in higher plants, one of them (*Avocado sunblotch viroid*) was shown to be able to replicate in a cyanobacterium and in the yeast *Saccha-*

6

Interviroy  
DOI: 10.1159/000509212

Bengone-Abogourin/Chelkha/Verdin/  
Colson

Downloaded by:  
138.104.128.05 - 3/26/2017 12:54:47 PM

*romyces cerevisiae* [33–35]. In addition, exogenous small RNAs such as miRNAs were shown to be capable of spreading between cells [36]. Moreover, it was demonstrated that the miRNA-168a from rice was present in the serum samples of Chinese individuals whose main diet was based on this plant, could bind to the low-density lipoprotein receptor adapter protein 1 (LDLRAP1) mRNA, and was able to downregulate its expression in hepatocytes [37].

Taken together, these findings question the potential of viroids and their derived small RNAs to cross kingdoms to interact with nucleic acids in humans. Viroids are prevalent in plants worldwide and could be ingested through consumption of fruits and vegetables. It can also be hypothesized that miRNA-like RNAs derived from these viroids can be either transferred from plants to humans or processed from viroids in human cells, and they could theoretically interact with human mRNAs. Further investigation is warranted to search for the presence of viroids in humans and test for their effect on mammalian cells in vitro.

#### Statement of Ethics

Not applicable: only bioinformatic analyses on sequences already available in databases were performed.

#### Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Funding Sources

This research work was supported by the French Government under the "Investments for the Future" program managed by the National Agency for Research (ANR), Méditerranée-Infection 10-IAHU-03, and was also supported by Région Provence Alpes Côte d'Azur and European funding FEDER PRIMMI (Fonds Européen de Développement Régional – Plateformes de Recherche et d'Innovation Mutualisées Méditerranée Infection). Mrs. Jessica Grace Bengone Abogourin received a grant from the IHU Méditerranée Infection foundation.

#### Author Contributions

Conceptualization: P.C. Methodology: P.C., J.G.B.-A., N.C. Analysis: J.G.B.-A., P.C., N.C., E.V. Writing – original draft preparation: J.G.B.-A., P.C. Writing – review and editing: P.C., J.G.B.-A., E.V.

#### References

- Balique F, Lecoq H, Raoult D, Colson P. Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans? *Viruses*. 2015 Apr; 7(4):2074–98.
- Gago-Zachert S. Viroids, infectious long non-coding RNAs with autonomous replication. *Virus Res*. 2016 Jan;212:12–24.
- Flores R, Hernández C, Martínez de Alba AE, Darós JA, Di Serio F. Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2005; 43(1):117–39.
- Diener TO. Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch Virol Suppl*. 1999;15:203–20.
- Seligmann H, Raoult D. Unifying view of stem-loop hairpin RNA as origin of current and ancient parasitic and non-parasitic RNAs, including in giant viruses. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Jun;31:1–8.
- Navarro B, Gisclé A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie*. 2012 Jul;94(7):1474–80.
- Hammann C, Steger G. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol*. 2012 Jun; 9(6):809–19.
- Hill JM, Lukiw WJ. Comparing miRNAs and viroids: highly conserved molecular mechanisms for the transmission of genetic information. *Front Cell Neurosci*. 2014 Feb;8:45.
- Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L, Zhu H. Cross-kingdom small RNAs among animals, plants and microbes. *Cells*. 2019;8:371.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan; 19(1):92–105.
- Lambert N, Gu SG, Zahler AM. The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jun; 39(11):4827–35.
- Rebolledo-Mendez JD, Vaishnav RA, Cooper NG, Friedland RP. Cross-kingdom sequence similarities between human micro-RNAs and plant viruses. *Commun Integr Biol*. 2013 Sep; 6(5):e24951.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan;120(1):15–20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec;115(7): 787–98.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):J154–8.
- Piva F, Principato G. RANDNA: a random DNA sequence generator. *In Silico Biol*. 2006; 6(3):253–8.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 2004 Jun;14(6):1188–90.
- Sand M, Skrygum M, Sand D, Georgas D, Gambichler T, Hahn SA, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res*. 2013 Jan;351(1):85–98.
- Komina A, Palkina N, Aksenenko M, Tsyrenzhapova S, Rukhsa T. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of MiR-1286 Inhibition in Melanoma Cells. *PLoS One*. 2016 Dec; 11(12):e0168229.
- Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1634–45.
- Kalra A, Bačić M, Tomas D, Zarković K, Bukovac A, Njirić N, et al. Different behaviour of DVL1, DVL2, DVL3 in astrocytoma malignancy and LEF1 upregulation. *J Cell Mol Med*. 2019 Jan;23(1):641–55.
- Gao J, Li H, Liu L, Song L, Lv Y, Han Y. Identification and functional analysis of risk-related microRNAs for the prognosis of patients with bladder urothelial carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):7297–303.

- 23 Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al.; Hematologic Malignancies Research Consortium. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood*. 2010 Dec;116(23):e118-27.
- 24 Stern-Ginossar N, Eflant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, et al. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*. 2007 Jul;317(5836):376-81.
- 25 Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. *Virology*. 2011 Mar;411(2):325-43.
- 26 Morales L, Oliveros JC, Fernandez-Delgado R, tenOever BR, Enjuanes L, Sola I. SARS-CoV-Encoded Small RNAs Contribute to Infection-Associated Lung Pathology. *Cell Host Microbe*. 2017 Mar;21(3):344-55.
- 27 Zhao Y, Cong L, Lukiw WJ. Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Jan;38(1):133-40.
- 28 Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, et al. A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol*. 2007 Mar; 81(6):2980-94.
- 29 Ding B, Itaya A. Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007 Jan;20(1):7-20.
- 30 Machida S, Yamahata N, Watanuki H, Owens RA, Sano T. Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J Gen Virol*. 2007 Dec;88(Pt 12):3452-7.
- 31 Martín R, Arenas C, Darós JA, Covarrubias A, Reyes JL, Chua NH. Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology*. 2007 Oct;367(1):135-46.
- 32 Friday D, Mukkara P, Owens RA, Baumstark T, Bruist MF. Processing of Potato spindle tuber viroid RNAs in yeast, a nonconventional host. *J Virol*. 2017 Nov;91(24):e01078-17.
- 33 Friday D, Mukkara P, Owens RA, Baumstark T, Bruist MF. Processing of Potato spindle tuber viroid RNAs in yeast, a nonconventional host. *J Virol*. 2017 Nov;91(24):e01078-17.
- 34 Hill JM, Zhao Y, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. miRNAs and viroids utilize common strategies in genetic signal transfer. *Front Mol Neurosci*. 2014 Feb;7:10.
- 35 Delan-Forino C, Maurel MC, Torchet C. Replication of avocado sunblotch viroid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol*. 2011 Apr;85(7):3229-38.
- 36 Chitwood DH, Timmermans MC. Small RNAs are on the move. *Nature*. 2010 Sep; 467(7314):415-9.
- 37 Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*. 2012 Jan;22(1):107-26.

## Discussion

We described for the first time 100% identity between several viroid fragments and the seed region, which acts in the RNA interference process, of various human miRNAs. Previously, similarities had also been noted between human miRNAs and the genomes of plant viruses, including tobamoviruses (Rebolledo-Mendez et al., 2013).

In the present study, the matches between filtered BLASTn results involved 100% identity between the seed region of several mature human miRNA sequences and viroid sequences or, as a control, randomly generated sequences. The following parameters were applied when processing the data:

1. A 100% sequence identity on the entire seed region of mature human miRNAs with viroids.
2. Sequence alignment lengths (ranging from 11 to 17) were selected to consider the robustness of the alignments.
3. A BLAST similarity based on an  $e$ value  $<1$  was considered as the probability of matching at the seed region of hsa-miRNA was not due to chance.
4. A  $\chi^2$  or Fisher's statistical test was used to compare the results obtained between viroid sequences and randomly generated sequences (a P value  $< 0.05$  was considered statistically significant).

Considering the cases where the viroid fragments were 100% similar to the entire seed region of the mature miRNAs from its beginning (position 1 or 2), there remained a total of 1501 matches of which 644, 725, 130, 1 and 1 had an alignment length of 11, 12, 13, 14 and 17 nucleotides, respectively. For the randomly generated sequences, we obtained only a single result. There was 100% of the similarity observed between the seed region of a human miRNA for a bit score value of 32.5 and for an alignment sequence length of 17 nucleotides in size.

Given that these similarity results concern a very short region, at least the length of the seed region, it is not surprising to obtain 100% similarities, which is observed here for randomly generated sequences, and has been previously observed for several plant viruses (Rebolledo-Mendez et al.,2013). Indeed, we have observed similarities with the seed regions of many other miRNAs than human miRNAs. Nevertheless, it is interesting to show that such similarities with human miRNAs exist for viroids although the sequences of these entities are themselves short (<450 nucleotides) and the number of viroid genomes available is not extremely large (15,924 with many very similar sequences). This is suggesting that if the viroids are present in humans, e.g. through consumption of plants, their sequences could interfere with the interaction zones between human microRNAs and messenger RNAs. In addition, we determined the lengths beyond the seed region of the microRNAs where 100% similarity could be observed, which is a condition for robust hybridization between the nucleic acid strands, and it turns out that this length is often longer than 10 nucleotides. Therefore, the aim here is not necessarily to show a high specificity of interactions between viroid fragments and the seed region of human microRNAs, but to show *in silico* that such interactions are possible.

## References

Rebolledo-Mendez JD, Vaishnav RA, Cooper NG, Friedland RP: Cross-kingdom sequence similarities between human micro-RNAs and plant viruses. *Commun Integr Biol* 2013;6:e24951

# PROJET III



# Travail de recherche





## *Avant-propos du Travail de recherche*

L'étude *in silico* précédente a montré des similarités entre les micro-ARN humains et les séquences de viroïdes. Ces résultats questionnent sur le potentiel réel des viroïdes et leurs petits ARN dérivés à interagir avec les acides nucléiques chez l'Homme. Au regard de ces résultats, le projet III a eu pour objectif de détecter *in vitro* des agents pathogènes sous-viraux (petits miARN exogènes, les viroïdes ou viroïdes-like) à partir d'échantillons cliniques et végétaux présentant ou non des symptômes de maladies d'étiologie connue. Les questions suivantes reliées à ce projet ont été les suivantes : Ces agents pathogènes sous-viraux sont-ils capables de se propager entre les cellules ? Peuvent-ils se lier à l'ARNm des cellules hôtes humaines et être capable de réguler l'expression des gènes cibles ?

L'objectif principal de ce troisième projet a été de détecter des séquences de micro-ARN dérivant d'entités viroïde-like dans des échantillons cliniques (plasma) en utilisant le séquençage à haut-débit. Ce afin de déterminer si de telles entités étaient présentes et ainsi capables d'interagir avec nos cellules.

Depuis plus d'une dizaine d'années, les nouvelles technologies de séquençage (NGS) ont été largement utilisées pour détecter et caractériser des agents phytopathogènes de façon non ciblée (François et al., 2018; Hadidi, 2019). Cette méthode a permis de détecter des virus de plantes déjà décrits ou non (Fox and Mumford, 2017; Pecman et al., 2017; Verdin et al., 2017), ainsi que des viroïdes (Brass et al., 2017; Hadidi, 2019; Pecman et al., 2017), des ARN ribosomiaux (Pecman et al., 2017), des viroïdes-like RNA (D. Jiang et al., 2017), et des petit ARNs interférents (small interfering RNA) provenant de phytovirus (Li et al., 2012) dans divers échantillons d'arthropodes (François et al., 2018), de végétaux (Verdin et al., 2017) et cliniques (Zhang et al., 2006). La technologie Illumina en particulier a été utilisée pour une

recherche non ciblée de viroïdes et de petits ARNs (Pecman et al., 2017). C'est la technologie que nous avons utilisée pour répondre aux objectifs du projet III.

Mots clés : miRNA, Viroïdes, Viroïdes-like, Clinique, Plasma, NGS

**Project title:**

**Detecting viroid-like small RNAs matching micro-RNAs in  
clinical and plant samples by next-generation sequencing**

**Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN<sup>1</sup>, Claudia ANDRIEU<sup>1</sup>, Said  
AZZA<sup>1</sup>, Clara ROLLAND<sup>1</sup>, Harilanto ANDRIANJAKARIVONY<sup>1</sup>, Eric  
VERDIN<sup>3</sup>, Philippe  
COLSON<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France;

<sup>2</sup> Aix-Marseille Univ., Institut de Recherche pour le Développement (IRD),  
Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), MEPHI, 27 boulevard Jean  
Moulin, 13005 Marseille, France; <sup>3</sup> INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, CS  
60094, 84140 Montfavet, France



## Introduction

Viroids are small, circular, non-coding naked RNA with a size ranging between 246-401 nucleotides (Diener, 1999; Flores et al., 2014). They cause diseases in herbaceous and woody plants only. Their interactions with host plants involve RNA interference and small viroid-derived RNA are generated during infection (Bengone-Abogourin et al., 2020; Dadami et al., 2017; Hill et al., 2014; Navarro and Di Serio, 2018). At least partly due to a compartmentalization between vegetal and animal virology, counterparts to viroids have not been searched in humans or animals (T. O. Diener, 2016). However, viroids have structural similarities with various RNAs harboring stem-loop hairpin including ribosomal and transfer RNAs, ribozymes, or repeated palindromic elements, and this make them possibly ancestral and central structural entities (Seligman et al., 2016). In humans, Delta agent that causes hepatitis may have derived from a viroid (Diener, 1993; Elena et al., 1991; Robertson, 1996). In addition, minimal Delta agent-like ribozymes were detected in the human microbiome (Riccitelli et al., 2014), and mini viral RNAs were reported to act as innate immune agonists (te Velthuis et al., 2018). Also, we found sequence similarities between viroids and human microRNAs (Bengone-Abogourin et al., 2019). Known and new viroids and viroid-like RNAs (Jiang et al., 2017; Pecman et al., 2017; Verdin et al., 2017; Verhoeven et al., 2017b), virusoids (AbouHaidar et al., 2014), small interference RNAs (siRNA) (Pecman et al., 2017; Verdin et al., 2017) as well as messenger RNAs (Sidharthan et al., 2020) originating from various food crops and ornamental samples have been detected by routine approach and discovered by random identification methods using next generation sequencing (NGS) (Hadidi et al., 2016; Navarro and Di Serio, 2018; Verdin et al., 2017).

For over ten years, new sequencing technologies (NGS) have been widely used to detect and characterize plant pathogens in a non-targeted manner (François et al., 2018; Hadidi, 2019). This method made it possible to detect plant viruses already described or not (Fox and Mumford, 2017; Pecman et al., 2017; Verdin et al., 2017), as

well as viroids (Brass et al., 2017; Hadidi, 2019; Pecman et al., 2017), ribosomal RNAs (Pecman et al., 2017), RNA-like viroids (D. Jiang et al., 2017), and small interfering RNAs from phytoviruses (Li et al., 2012) in various arthropod samples (François et al., 2018), of plants (Verdin et al., 2017) and of clinical samples (Zhang et al., 2006). Illumina technology in particular has been used for non-targeted research for viroids and small RNAs (Pecman et al., 2017). Here we used next-generation sequencing to generate short sequences to detect putative viroid-like entities in human plasma samples.

## Materials and Methods

Six plasma samples from two patients infected with human immunodeficiency virus (n=2), one patient co-infected with Delta agent and hepatitis B virus (n= 1), one kidney transplant recipient (n= 1), one patient with respiratory infection (n= 1) and one healthy patient (n=1) were included in the study. In addition, four plant samples were included. The first one (named NGS1) was cucumber leaves tripled infected with *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV, *Tobamovirus*), *Coccinia mottle virus* (CocMoV, *Ipomovirus*) and suspected *betaflexiviroides*, one healthy tomato sample. The second one (named NGS2) was a viroid-infected tomato (tomato apical stunt viroid, *Pospiviroid*). RNA Pool of tomato apical stunt viroid and citrus excocortis viroid (named TasvCev) and one healthy tomato plant sample (named HS).

Total RNA samples were extracted by EZ1 Advance XL automated extraction (Qiagen, Valencia, CA) for the clinical samples and by TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for the vegetal samples. Samples were eluted with DNase-free water then were treated with DNase using TURBO DNase (2 U/ $\mu$ l) (Life Technologies, Carlsbad, California). Removal of genomic DNA was checked by LightCycler Multiplex DNA Master kit and LightCycler Multiplex SYBR green I Master 1 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) on a CFX96 Touch real-time PCR instrument (BioRad Laboratories, Inc). Thereafter, all RNA

samples were quantified by the Qubit RNA HS kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California). Complementary DNA synthesis was performed by RT-PCR amplification (Life Technologies, # 18064-014). Library profile quality control was performed by high sensitivity DNA chip (2100 Agilent Bioanalyser Desktop system, Agilent # G2940CA). Amplicon purification was performed by polyacrylamide gel electrophoresis and short RNA recovery was carried out using gel breaker tube columns for all generated libraries sizing between 100-200 base pairs (bp), (TruSeq Small RNA Library Prep Reference Guide # 15004197 v02). Library preparation step further used Standard TruSeq RNA sample preparation Kit v2 (Set A adaptors 50 cycles, Illumina, #RS-122-2001). Small DNA libraries sizing between 22 to 33 nucleotides were generated then concentrated and pooled at equal volume (Illumina, TruSeq Library Prep Pooling Guide # 15042173). Sequencing was performed on a MiSeq instrument (Illumina, MiSeq System, protocol A: Standard normalisation method) using pre-filled MiSeq ready-to-use reagent cartridges Kits v2 (50-cycles # MS-102-2001). A normalisation step was carried out by denaturing and diluting libraries to a final concentration of 2 nM to reach a 10 pM loading concentration (Illumina, Denature and Dilute Libraries Guide # 15039740 v03 MiSeq Reagent Kit). An “in-lane” PhiX spike-in of 1% combined to the library was included at low concentration as sequencing control. All sequence reads were imported into the CLC Genomics Workbench version 7.5.0 (Qiagen, Hilden, Germany). The adaptor sequences were removed, and we exported filtered, trimmed, assembled reads. A fastQC report from online FASTAQC quality control software (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) was generated to check the quality of raw MiSeq output FastaQ sequences per base sequence quality and per base sequence quality score. We performed BLASTn searches for obtained sequences against the NCBI GenBank nucleotide sequence database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a database of 15,294 viroids collected from GenBank (Bengone-Abogourin et al., 2020) , and the miRbase (Griffiths-Jones et al., 2008). Due to the small size of obtained sequences used as queries, relaxed BLASTn



parameters were used (evaluate 1000 -word\_size 5 -reward 1 -penalty -1 -gapopen 2 -gapextend 2). Figure 16 shows the overall workflow used for sequencing and analysing the samples.

## Results

A total of ten samples, of which 6 were clinical and 4 were plant samples were analysed. Among the selected clinical samples, we had two HIV infected patients (8160D and 8160C); one patient infected with the Delta agent (619); one patient infected with a respiratory infection (401); one kidney transplant patient (2579) and finally one healthy patient as a negative control (NC). Among the plant samples we had, one sample of cucumber leaves tripled infected with *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV, *Tobamovirus*) and *Coccinia mottle virus* (CocMoV, *Ipomovirus*) and suspected *betaflexiviroides*. (NGS1); one tomato infected with a viroid (tomato apical stunt viroid, *Pospiaviroid*) (NGS2); one sample of TASVd RNA pooled with CEVd (TasvCev, DSMZ strains) to be used as an additional viroid positive control with NGS 2; and finally, one sample of healthy plant (HS) to be used as a negative control. The TCDVd-infected tomato plants were used as controls for the study (inoculation with leaves infected with a TCDVd strain from DSMZ). The RNA extracts from TCDVd-infected plants showed symptoms 6 months after of viroid inoculation on tomato plants (Figure 17 .a, 17b). The RNA integrity agarose gel test is included in Figure 17.c. The RT-PCR tests targeting *Pospiaviroidae* family confirmed viroid infection by TCDVd.

The results of qRT-PCR from 6 human plasma samples and 4 plant samples after RNA extraction and DNase treatment, of which 2 plant samples contained viroids, were presented in Figure 18 a; 18b; 18c; 18d. The gels 1 and 2 in figure 19 show cDNAs random amplification from clinical and plant samples using the Illumina library preparation protocol (TruSeq Small RNA Library Prep). This figure 19 shows all amplified and indexed samples cut out from gels before the purification and the sequencing steps (6 clinical samples 8160D, 8160C, 619, 401, 2579; NC and 4 plant

samples NGS1, NGS2, TasvCev, HS).

Figures 21 and 22 show the Bioanalyzer electropherograms RNA profiles (Agilent 2100 Bioanalyzer system) of the 6 selected clinical and 4 selected plant samples after library preparation and size selection. RNA integrity is presented for each sample. Among the initial 10 selected samples, only selected 4 out 6 clinical samples (8160D, 8160C, 2579 and 619) and 2 out 4 (NGS1 and NGS2) were finally sequenced. The raw data from the NGS sequencing were summarized in the Figure 22 and Table 1. The overall range size of the read length distribution for the human plasma sample and the plant samples was between 34 and 36 nt (Figure 22). A total of 1,104,513 reads 1x50 base pairs were generated. Summary statistics such as reads counts and contig lengths is recorded in Table 1. The majority of these 1,104,513 reads generated (93.5%) corresponded almost exclusively to N-chains and were therefore eliminated. The remaining 71,051 reads had an average size of approximately 35 nucleotides (Table 1).

## Discussion

We performed a non-strand specific RNA-sequencing using Illumina second generation sequencing technology for the identification of small RNA from human plasma samples and plant leaves. The aim of this experiment was to detect and generate short sequences to detect fragments of known viroids, microRNAs, or short RNAs in human plasma samples and plant-derived samples (Figure 16.a shows the protocol used to process the different samples). A total of ten samples, of which 6 were clinical and 4 were plant samples were tested. Among the initial 10 selected samples, only 4 out of 6 clinical samples (8160D, 8160C, 2579 and 619) and 2 of 4 plant samples (NGS1 and NGS2) were finally sequenced as the cDNA concentration of the other samples was inappropriate.

A first part of this project was to develop viroid positive controls for the NGS experiment (Figure 17.a). A second part was to validate the symptoms development on TCDVd-inoculated plants by visual (Figure 17.b) and molecular tests (Figure 17.c). The integrity of the extracted RNA was demonstrated by the presence of 16s and 23s ribosomal RNA (INRAE, MontFavet) (Figure 17.c). The qRT-PCR on DNase-treated samples from all 6 human plasma samples and 4 plant samples that targeted albumin gene or beta-tubuline gene, respectively, were negative (Figures 18 a; b; c; d). Then, we used the high-resolution automated electrophoresis of DNA (2100 Bioanalyzer instrument) for the sample quality control suitable for next-generation sequencing (NGS). Unfortunately, not all the prepared amplified-indexed-cDNAs samples from selected plant and clinical samples did not pass the quality control steps (Figure 21 and 22). Only 4 out of the 10 initial samples could meet the minimum required RNA integrity number (RIN) value of 7-8 recommended by Illumina Inc. However, we used also clinical samples with low RIN. The following clinical samples were chosen (8160D; 8160C; 619 and 2579) and for the plant samples only NGS1 and NGS2, respectively virus and viroid controls were selected.

Finally, none of the generated sequences corresponded to known viroid sequences, including the tomato apical stunt viroid present in one of the samples. Furthermore, we did not observe any significant similarities with microRNA sequences. Additionally, the analysis of similarities with sequences from the GenBank database did not identify any robust similarities, nor did we find any consistency between the hits and the nature of the biological samples tested. To resume, our present study did not confirm the detection of viroids from viroid plant control samples and it did not reveal the presence of short RNA of potential interest, or we could recognize as of potential interest, in human plasma samples.

Therefore, a full re-evaluation of the high-throughput sequencing protocol and its optimisation for clinical and plant samples will therefore be necessary. Firstly, carefully selecting more appropriate controls. They should contain greater amount of known nucleic acid of expected size and should encounter limited processing such as repeated thawing and freezing at the different steps of the NGS preparation. Secondly, there is a crucial step to be included in the present protocol which is the need for sample enrichment. Thirdly, a more sensitive and accurate quantification method such as qubit fluorometric quantification as compared to nanodrop UV absorbance measurements should be in used at all critical steps (after RNA extraction and during all the normalization steps before and after library preparation). The first one has been shown to discriminate DNA and RNA molecules from the same sample, while the latter cannot distinguish DNA and RNA molecules and is not recommended for low concentration samples (2 ng/ $\mu$ L).

With more recent experience acquired on the NGS field, we feel that spending more time optimizing the protocol may allow running better NGS experiments.

Figure 16

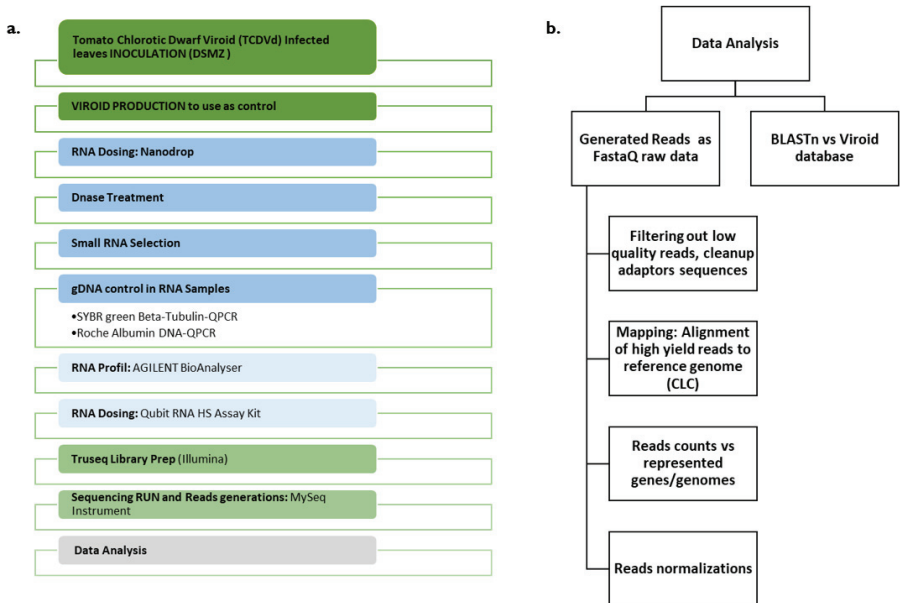


Figure 16: Overall protocol workflow

- a. Sample processing workflow from extraction to library preparation and sequencing;
- b. Raw sequences analysis workflow.

Figure 17

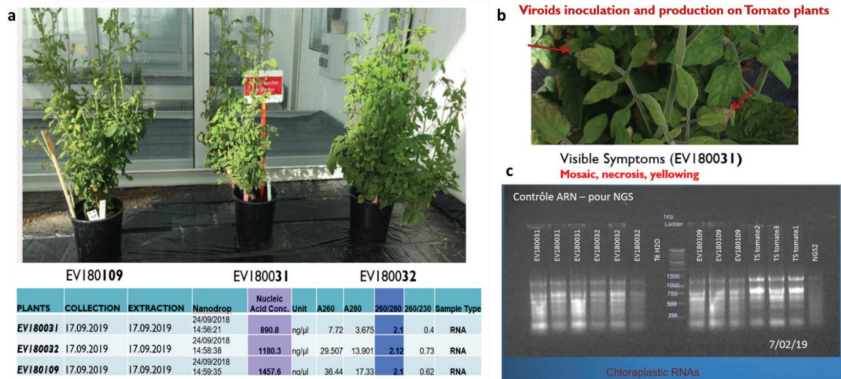


Figure 17: Developing viroids positive controls for NGS experiment

- TCDVd Infected tomatoes used as controls for the study (TCDVd infected leaves, DSMZ strain).
- Symptom's development: TCDVd infected leaves showing symptoms after about 6 months of viroid's inoculation on Tomato plants.
- Gel results of on 1.5% agarose gel to check the integrity of the extracted RNA evidenced the presence of the 16s and 23s ribosomal RNA (30 minutes run at 90 volt); INRAE (MontFavet) Infected plants EV180031, EV180032, EV180109: TCDVd infected tomato leaves; Té H2O: extraction water (extraction negative control).  
1 KB Ladder: 250/500/750/1KB/1.5/2/2.5/3/4/5/6/8/10KB.

Figure 18

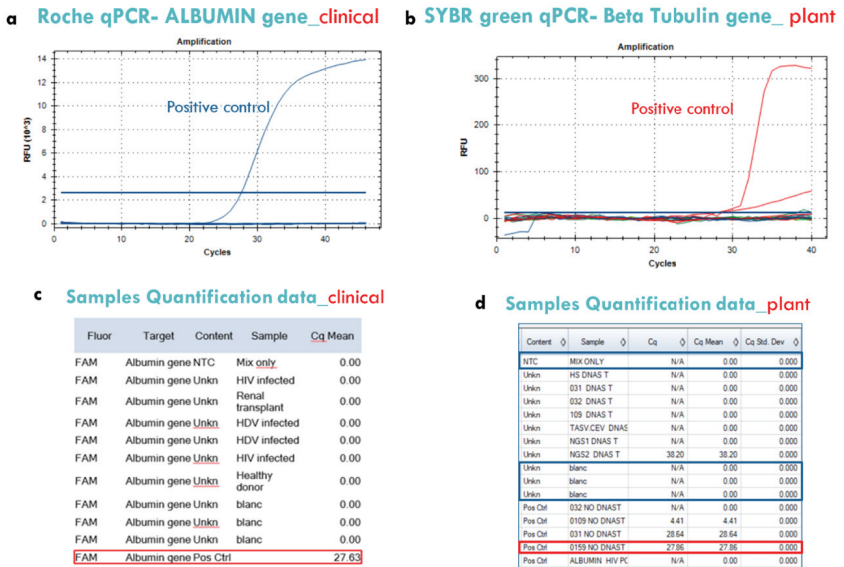
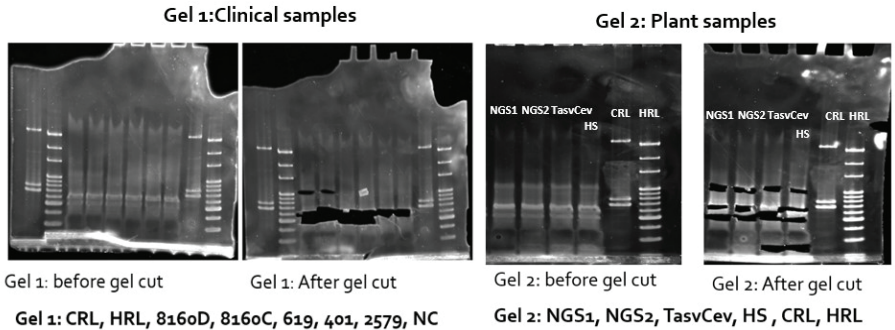


Figure 18 : Clinical and plant samples Quantification data after RNA extraction and DNase treatment

a. Clinical samples qPCR Quantification curve; b . Plant samples qPCR Quantification curve. c. Clinical samples qPCR Quantification data ; d. Plant samples qPCR Quantification data.

**Figure 19**



**Figure 19: Polyacrylamide Gel 1 and 2 before and after sample cut of amplified libraries following Illumina library amplification and TruSeq Small RNA Library Prep of selected patients and plants samples; before NGS sequencing step**

Legends:

- **CRL: Custom Ladder 3 bands;** dsDNA fragments 145bp, 160bp, 500bp
- **HRL: High Resolution DNA Ladder;** dsDNA fragments 100, 120, 140, 145,160,180,200, 300, 400, 500bp
- **6 Clinical samples 8160D, 8160C, 619, 401, 2579;** NC Sample 8160D: HIV infected patient; 8160C: HIV infected patient; 619: Delta agent infected patient; 401: respiratory infected patient; 2579: Renal transplant; NC: Negative control patient
- **4 Plant samples NGS1, NGS2, TasvCev, HS, CRL, HRL;** NGS1: cucumber leaves tripled infected with *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV, *Tobamovirus*) and *Coccinia mottle virus* (CocMoV, *Ipomovirus*) and suspected *betaflexiviroides.*; NGS2: viroid-infected tomato (tomato apical stunt viroid, *Pospiviroid*); TasvCev : RNA Pool of *tomato apical stunt viroid* and *citrus excocortis viroid* (both *Pospiviroid*) used as positive controls RNA (DSMZ); HS: healthy tomato plant sample.



Figure 20

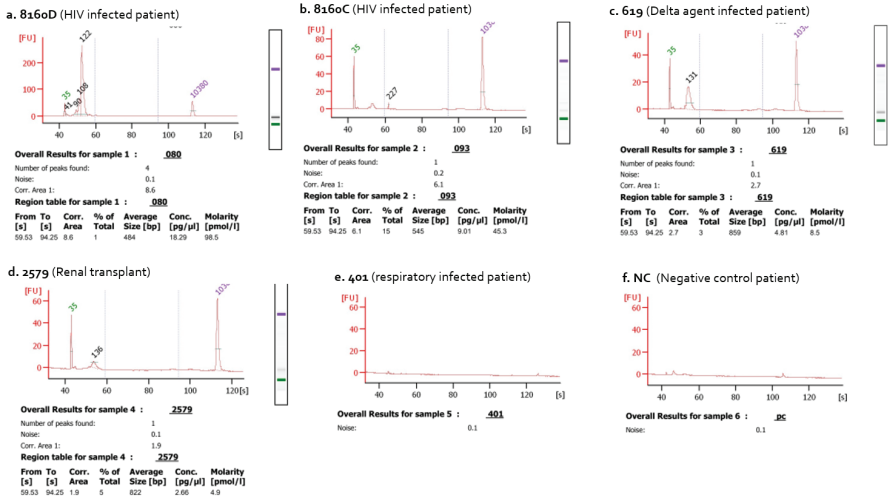


Figure 20: Bioanalyzer electropherogram DNA library profiles (Agilent 2100 Bioanalyzer system) of the 6 selected clinical samples after library preparation and size selection

a. Clinical sample 8160D (HIV infected patient); b. Clinical sample 8160C (HIV infected patient); c. Clinical sample 619 (Delta agent infected patient); d. Clinical samples 2579 (Renal transplant); e. Clinical sample 401 (respiratory infected patient); f. Clinical sample NC (Negative control patient).

Figure 21

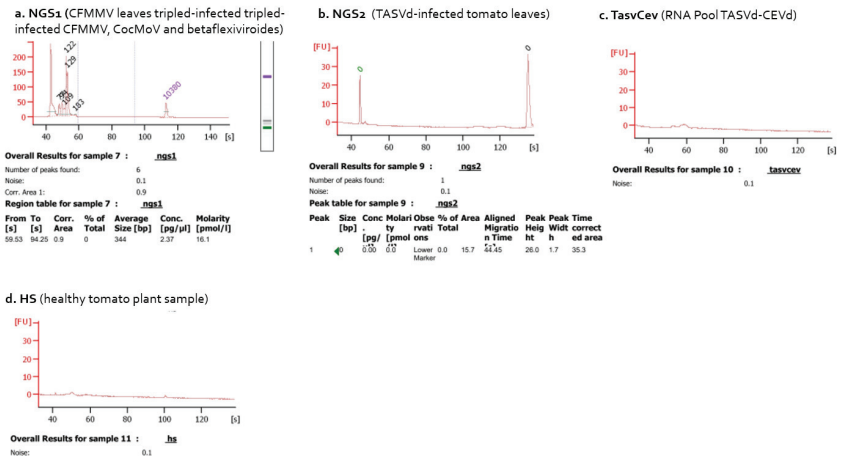


Figure 21: Bioanalyzer electropherogram DNA library profiles (Agilent 2100 Bioanalyzer system) of the 4 selected plant samples after library preparation and size selection

a. Plant sample NGS1 (triple-infected CFMMV, CocMoV and betaflexiviroïdes, plant virus positive control); b. Plant sample NGS2 (TASVd-infected tomato, viroid positive control); c. Plant sample TasvCev (RNA Pool TASVd-CEVd, viroid positive controls) d. Plant sample HS (healthy tomato plant sample).

Figure 22

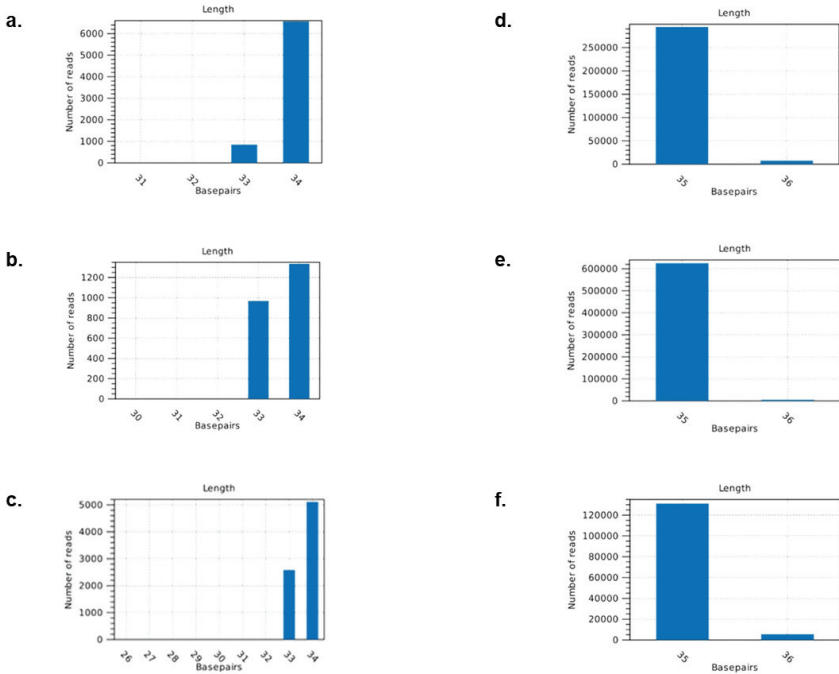


Figure 22: Distribution of read lengths for the human plasma sample and the plant samples

a. 8160D (HIV sample); b. 8160C (HIV sample); c. 2579 (Renal transplant sample); d. 619 (HDV sample); e. NGS1 (virus sample); f. NGS2 (viroid sample).

**Table 1.**

**Table 1 : Read numbers and length**

Sample Id.	Count	Average length	Total bases
<b>8160D</b>	7,788	33.87	263,780
<b>8160C</b>	2,328	33.57	78,159
<b>2579</b>	7804	33.65	262,637
<b>619</b>	8,471	35.9	303974
<b>NGS1</b>	29,364	35.8	1,051,172
<b>NGS2</b>	15,746	35.4	556,835

## References

- AbouHaidar, M.G., Venkataraman, S., Golshani, A., Liu, B., Ahmad, T., 2014. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14542–14547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402814111>
- Bengone-Abogourin, J.G., Chelkha, N., Verdin, E., Colson, P., 2020. Sequence Similarities between Viroids and Human MicroRNAs. *Intervirology* 1–8. <https://doi.org/10.1159/000509212>
- Brass, J.R.J., Owens, R.A., Matoušek, J., Steger, G., 2017. Viroid quasispecies revealed by deep sequencing. *RNA Biol.* 14, 317–325. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272745>
- Dadami, E., Dalakouras, A., Wassenegger, M., 2017. Viroids and RNA Silencing, in: *Viroids and Satellites*. Elsevier, pp. 115–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00011-5>
- Diener, T., 2016. Viroids: “living fossils” of primordial RNAs? *Biol. Direct* 11. <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0116-7>
- Diener, T.O., 1993. Hepatitis delta virus-like agents: an overview. *Prog. Clin. Biol. Res.* 382, 109–115.
- Elena, S.F., DoPAZO, J., FLORESt, R., Moya, S., 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis 6 virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 4.
- François, S., Filloux, D., Fernandez, E., Ogliastro, M., Roumagnac, P., 2018. Viral Metagenomics Approaches for High-Resolution Screening of Multiplexed Arthropod and Plant Viral Communities, in: Pantaleo, V., Chiumenti, M. (Eds.), *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 77–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_7)

- Hadidi, A., 2019. Next-Generation Sequencing and CRISPR/Cas13 Editing in Viroid Research and Molecular Diagnostics. *Viruses* 11, 120. <https://doi.org/10.3390/v11020120>
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., Barba, M., 2016. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front. Microbiol.* 7, 1325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>
- Hill, J.M., Zhao, Y., Bhattacharjee, S., Lukiw, W.J., 2014. miRNAs and viroids utilize common strategies in genetic signal transfer. *Front. Mol. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00010>
- Jiang, J., Zhang, Z., Hu, B., Hu, G., Wang, H., Faure, C., Marais, A., Candresse, T., Li, S., 2017. Identification of a viroid-like RNA in a lychee Transcriptome Shotgun Assembly. *Virus Res.* 240, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.012>
- Li, R., Gao, S., Hernandez, A.G., Wechter, W.P., Fei, Z., Ling, K.-S., 2012. Deep Sequencing of Small RNAs in Tomato for Virus and Viroid Identification and Strain Differentiation. *PLoS ONE* 7, e37127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037127>
- Navarro, B., Di Serio, F., 2018. Double-Stranded RNA-Enriched Preparations to Identify Viroids by Next-Generation Sequencing, in: Pantaleo, V., Chiumenti, M. (Eds.), *Viral Metagenomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 37–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_3)
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnkar, M., 2017. Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Riccitelli, N.J., Delwart, E., Lupták, A., 2014. Identification of minimal HDV-like ribozymes with unique divalent metal ion dependence in the human microbiome. *Biochemistry* 53, 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/bi401717w>
- Robertson, H.D., 1996. How Did Replicating and Coding RNAs First Get Together? *Science* 274, 66–67. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.66>

- Seligmann, H., Raoult, D., 2016. Unifying view of stem–loop hairpin RNA as origin of current and ancient parasitic and non-parasitic RNAs, including in giant viruses. *Curr. Opin. Microbiol., Environmental microbiology \* Special Section: Megaviromes* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.004>
- Sidharthan, V.K., Sevanthi, A.M., Jaiswal, S., Baranwal, V.K., 2020. Robust Virome Profiling and Whole Genome Reconstruction of Viruses and Viroids Enabled by Use of Available mRNA and sRNA-Seq Datasets in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Front. Microbiol.* 11, 1232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01232>
- te Velthuis, A.J.W., Long, J.C., Bauer, D.L.V., Fan, R.L.Y., Yen, H.-L., Sharps, J., Siegers, J.Y., Killip, M.J., French, H., Oliva-Martín, M.J., Randall, R.E., de Wit, E., van Riel, D., Poon, L.L.M., Fodor, E., 2018. Mini viral RNAs act as innate immune agonists during influenza virus infection. *Nat. Microbiol.* 3, 1234–1242. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0240-5>
- Verdin, E., Wipf-Scheibel, C., Gognalons, P., Aller, F., Jacquemond, M., Tepfer, M., 2017. Sequencing viral siRNAs to identify previously undescribed viruses and viroids in a panel of ornamental plant samples structured as a matrix of pools. *Virus Res.* 241, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.019>
- Verhoeven, J.T.J., Koenraadt, H.M.S., Westenberg, M., Roenhorst, J.W., 2017b. Characterization of tomato apical stunt viroid isolated from a 24-year old seed lot of *Capsicum annum*. *Arch. Virol.* 162, 1741–1744. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3277-5>
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.-Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4, e3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>

# PROJET IV





# Travail de recherche



## *Avant-propos du Projet IV*

Des études précédentes ont montré la présence de tobamovirus chez l'humain et qu'ils pouvaient être associés à des signes cliniques et une réponse immunitaire chez l'Homme. Dans ces travaux fondateurs, nous avons montré la présence du Virus de la marbrure douce du poivre (PMMoV) dans les selles humaines tabasco (Colson et al., 2010), et du virus de la mosaïque du tabac (TMV) dans la salive des fumeurs (Baliq et al., 2012). De plus, ces tobamovirus ont été trouvés dans des sauces à base de poivre (Colson et al., 2010) et des cigarettes (Baliq et al., 2012), respectivement, indiquant une exposition humaine. D'ailleurs, d'autres données ont été décrites par d'autres équipes. Ainsi, des anticorps anti-TMV ont été décrits aux États-Unis chez des fumeurs par Liu et al. (Liu et al., 2013) et très récemment, au Mexique, l'analyse par séquençage de nouvelle génération d'échantillons d'oropharynx et de matières fécales chez trois enfants sains de moins de 1 an dans une communauté semi-rurale a retrouvé au moins un virus de plante dans 100% des échantillons de matières fécales et dans 65 % des échantillons d'oropharynx (Aguado-García et al., 2020). Les tobamovirus étaient de loin les virus de plantes les plus fréquemment détectés, et les virus les plus communs étant *Tropical soda apple mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, and *Opuntia tobamovirus 2*.

Dans le projet suivant, nous nous sommes intéressés à la détection des tobamovirus, en particulier du tomato mosaic virus (ToMV) et le pepper mild mottle virus (PMMoV) dans les fruits de consommation et dans les produits alimentaires à base de tomates retrouvés en commerce tels que les sauces à base de tomate, notamment les ketchups et sauces tomates. Nous avons testé si les produits alimentaires dérivés de tomates exposées et sensibles aux tobamovirus pouvaient être positifs en RT-PCR pour le virus de la mosaïque de la tomate, ou d'autres tobamovirus, tandis que les fruits de tomates vendus et destinés directement à la

consommation, cultivés sous serres, résistants aux tobamovirus étaient négatifs en RT-PCR. La positivité des RT-PCR tobamovirus uniquement pour les produits alimentaires dérivés de tomates questionnent sur une exposition de l'homme à ces virus. L'inoculation sur plante n'a pas montré de symptômes indiquant la présence de virus infectieux dans ces produits, mais il est possible que les inocula ou les conditions expérimentales n'aient pas été optimales.

Mots clés : Tobamovirus, ToMV, PMMoV, Plantes, Humains, Sauces tomates

## Article de Recherche

# Presence of tobamoviruses in tomato-derived food products

*Bengone-Abogourin JG, Verdin E, Colson P.*



## TITLE PAGE

**Type of article: Short communication**

**Full-length title: Presence of tobamoviruses in tomato-derived food products**

**Short title (for the running head): Tobamoviruses in food items**

**Author list: Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN<sup>1</sup>, Eric VERDIN<sup>3</sup>,  
Philippe COLSON <sup>1,2\*</sup>**

**Affiliations :** 1 Aix-Marseille Univ., Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), MEPHI, 27 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France ; 2 IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France ; 3 INRAE, UR407, Unité de Pathologie Végétale, CS 60094, 84140 Montfavet, France

\* Corresponding author: Philippe Colson, IHU Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Tel.: +33 413 732 401, Fax: +33 413 732 402; email: philippe.colson@univ-amu.fr

Key words: ToMV; PMMoV; Tobamovirus; sauce; ketchup

Word counts: 1374

Figure: 1; Table: 0; References: 16





## Introduction

There is a strong compartmentalization between the fields of human and animal virology on the one hand and of plant virology on the other hand (Balique et al., 2015a). In previous seminal works, we showed the presence of pepper mild mottle virus (PMMoV) in human stools (Colson et al., 2010), and of *Tobacco mosaic virus* (TMV) in saliva of smokers (Balique et al., 2012). In addition, these tobamoviruses have been found in pepper-derived sauces (Colson et al., 2010) and cigarettes (Balique et al., 2012), respectively, indicating human exposure. Moreover, antibodies to TMV were described in smokers (Liu et al., 2013).

Another major tobamovirus is tomato mosaic virus (ToMV), which infects tomatoes. Tomatoes used to produce sauces, coulis, and condiments such as ketchup are grown almost exclusively in open fields. Most of these tomato varieties lack genes for resistance to tobamoviruses (Hamamoto et al., 1997). Their infection and the symptoms they develop do not necessarily limit their use to produce tomato-based food items. This is not the case of directly marketed tomato fruits that need to be devoid of visible symptoms. They are cultivated under cover (greenhouse and tunnels) carrying tobamovirus resistance genes. Here, we searched for the presence of tobamoviruses in tomatoes-derived sauces and in tomato fruits.

## Materials and Methods

Food items analysed included 50 ketchup sauces, 3 concentrated tomato purées, 2 grinded dry chili peppers (one from Algeria, and one from unknown origin bought from an African restaurant in Marseille), 3 pasta tomato sauces, and 50 fresh cherry tomatoes bought in groceries stores or supermarkets in Marseille, France (Figure 23). Moreover, fresh tomatoes samples such as 6 heirloom variety tomatoes and 32 round tomatoes from Terre de Provence greengrocer, and 29 round tomatoes from Lidl and Casino supermarkets were included in the study. Moreover, we included 2 tobamovirus infected leaves samples used as PMMoV positive control (strain P3, pepper), one ToMV positive control (strain SM1, tomato), and one Healthy tomato sample used as negative control (tomato). Those 3 last samples were provided by the INRA, Avignon.

Before processing all samples by molecular analyses, each of all fresh tomato sample namely 50 cherry tomatoes, and 29 round tomatoes all from supermarkets (Casino and Lidl), 6 heirloom variety tomatoes and 32 round tomatoes from Terre de Provence greengrocer, was cut into small pieces and 800  $\mu$ L of the resulting tomato juice was used for the lysis and homogenisation step as shown in figure 24. Moreover, 5 inoculating loops of each the ketchup and pasta tomato sauce sample were diluted into 400  $\mu$ L of RNase/DNase free water. Each dry chili pepper sample was grinded into 400  $\mu$ L of RNase/DNase free water. The resulting tomato sauce dilutions and dry chili pepper grinded mixes were used for the lysis and homogenisation step as shown in figure 24.

Afterwards, a volume of 500  $\mu$ L of lysis buffer (MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems; ref. A27828) was added to each of all samples (tomato fruits and processed sauces, dried chilies) prior to homogenisation using the FastPrep-24 homogenizer and centrifugation at 1,300 g for 4 min. Afterwards, RNA was extracted from 200  $\mu$ L of supernatant using the EZ1 virus mini kit v2.0 on the EZ1 automate (Qiagen) (figure 24).

RT-PCR amplification was carried out using the SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) with two PCR primer set targeting the tobamoviruses replicase gene (Gibbs et al., 1998; Li et al., 2018). Melting temperature was changed to 52°C using the Li et al. primer set reported in 2018. The RT-PCR reaction was performed as follows: 5 µL of RNA were added to 40 µL of reaction mix containing 1 µL (10 pmol/µL) of primers, 1 µL of SuperScript II RT/Platinum Taq DNA Polymerase mix (Invitrogen), 25 µL of RT mix reaction buffer 2X, and 12 µL of RNase-free water. The first PCR protocol (Li et al., 2018) was performed as follows: 43°C for 45 min for the reverse transcription step; 94°C for 3 min then 39 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 min. The second RT-PCR protocol (Gibbs et al., 1998) was performed as follows: 42°C for 45 min for the reverse transcription step; then 3 min at 94°C, and 39 cycles of 30 s at 94°Cs, 45 s at 43°C, 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 min. Expected amplicon size products were 876 base pairs (bp) (Li et al., 2018) and 880 bp (Gibbs et al., 1998), respectively).

Sanger sequencing use the same primers than for PCR with the Big Dye Terminator cycle sequencing kit v1.1 on an ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). The phylogenetic trees were constructed as shown in figure 27. The pasta tomato sauce sample “Panzani M” (strain L316321), the PMMoV positive control (strain P3, pepper), the ToMV positive control (strain SM1, tomato) and the dry chili pepper sample (PMMoV strain L316321, from Algeria) were included in the tree. Unfortunately, the length of the ketchup sample “KetA” was too short to be shown in the tree. Moreover, 3 “anonymous samples”, unrelated to this study were included in the because there were closely related to PMMoV or ToMV.

Among these sequenced tomato sauces, two positive tobamoviruses samples (ketchup “KetA” and Panzani pasta tomato sauce “Panzani M”) and two negative samples (ketchup “J” and pasta tomato sauce “Panzani\_M”) were used to inoculate the following host plants susceptible to tobamoviruses: tobacco *N. tabacum Samsun* (30

plants), tobacco *N. benthamiana* (30 plants), tomato *Solanum lycopersicum* Monalbo (30 plants) and pepper *Capsicum annuum* Yolo wonder (9 plants) (Table 3).

For inoculation tests, ketchup and pasta tomato sauce samples were diluted (1:5, 1:10 and 1:20) and each dilution were mixed with 1/5th of grinding buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O: 0.03 M; 0.2% Sodium diethyl-dithiocarbamate trihydrate). Then 300 mg of carborundum (abrasive) and 300 mg of activated charcoal were added and well homogenised. Afterwards, young host plants susceptible to tobamoviruses (2-4 cotyledon stage) were used for inoculation with each dilution of tomato sauces. For each plant, the upper part of 2-3 young leaves and cotyledons were gently rubbed with a gloved finger. The inoculated host plants were incubated in the greenhouse for 5 weeks (Table 3).

## Results and Discussion

### RT-PCR tests and sequencing of food samples

Ketchup, tomato sauces and dry chili peppers as well as tomato fruits from supermarkets were tested by RT PCR for the presence of tobamoviruses using 2 set of *tobamovirus* primers. The expected size was obtained with only 1 sample (Panzani M) with the 2 set of primers (Figure 25).

Panzani M positive sample was confirmed by sequencing (Figure 25). BLASTn analysis of the nucleotide sequence shown that the closest nucleotide sequence matched with PMMoV (AB716964.1). In addition, we randomly sequenced several food samples that did not produce any visible RT-PCR bands on agarose gel. Surprisingly, one RT-PCR negative ketchup sample (KetA) using Li et al. primer set was successfully sequenced (3 replicates). BLASTn analysis of the nucleotide sequence of panzani M showed the closest nucleotide sequence matched at 95.69 % with PMMoV (accession number AB716964.1) and KetA shown that the closest nucleotide sequence matched at 91.57 with ToMV (accession number MH507165.1) (Table 2).

The first phylogenetic tree presented in figure 27 showed that sample “Panzani M” (strain L316321) amplified by Li et al. RT-PCR system (Li et al., 2018) (a) is closer to the PMMoV. Likewise, the dry chili pepper sample (PMMoV strain L316321 from Algeria) and the PMMoV positive control (strain P3, pepper) are closer to PMMoV, both amplified by Gibbs et al. RT-PCR system (Gibbs et al., 1998) (figure 27 b). As expected, the last phylogenetic tree (figure 27 c), showed that the ToMV positive control (strain SM1, tomato) is closer to ToMV. As mentioned before, we failed to add the “KetA” sample on this last tree (a). We expected that the “KetA” sample would have been closer to the ToMV as shown for the ToMV positive control (strain SM1, tomato).

#### **Plant inoculation with tobamovirus positive ketchup and tomato sauce samples**

Inoculations were made with 3 dilutions for 2 tobamoviruses positive tomato sauce samples, KetA and Panzani M samples. To check their infectivity, we tested these samples on a range of susceptible plants (table 3). These plants were incubated in the greenhouse for 5 weeks. No symptoms were observed on any inoculated plants 5 weeks after inoculation (Figure 28). RT-PCR tests with Gibbs’s primers were performed on several inoculated plants to check for the presence of tobamoviruses (highlighted boxes in blue, table 3). No fragments of the expected size were detected (Figure 28). This negative result means that either the tobamoviruses detected in the first RT PCR tests were present in small quantities or were poorly distributed in the ketchup used for inoculation; or it was a handling artefact (false positive).

In this preliminary work, we were able to detect the presence of ToMV in food products derived from tomatoes, but not in tomato fruits intended for direct consumption. Although performed on a small number of samples, this result is in line with the fact that tobamovirus-infected tomatoes can be used to manufacture tomato-derived products. The inoculation of processed food items to susceptible plants did not lead to symptoms. Therefore, we did not provide here evidence that the viruses

found in this study remain infectious after undergoing the food item manufacture process. This may be related to a low viral inoculum or to non-optimal inoculation procedures, and this should be tested more thoroughly in future studies.

PMMoV and ToMV that cause mosaic-related symptoms to several species belonging to the *Solanaceae* family such as pepper, tobacco and tomatoes. Recently, productions of solanaceous crops were seriously affected by two members of the genus *Tobamovirus*, the highly stable *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) and in particular the *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) causing serious damages on *Tobamovirus* resistant tomatoes (Smith et al., 2018; Webster et al., 2014). The interaction of those very resistant tobamoviruses with mammals including humans is therefore worthy to be explored. Interestingly, following the results of studies suggesting that smoking may protect against SARS-CoV-2 infection on the basis that the prevalence of smoking in patients hospitalized for COVID-19 was lower than in the general population, it has been proposed that, alongside nicotine and other chemicals present in tobacco smoke, TMV may be involved in this effect (de Bernardis and Busà, 2020). Overall, we probably largely underestimated the amount of plant viruses we may ingest. Studies should be of interest to evaluate their possible interaction with animal organisms.

Figure 23

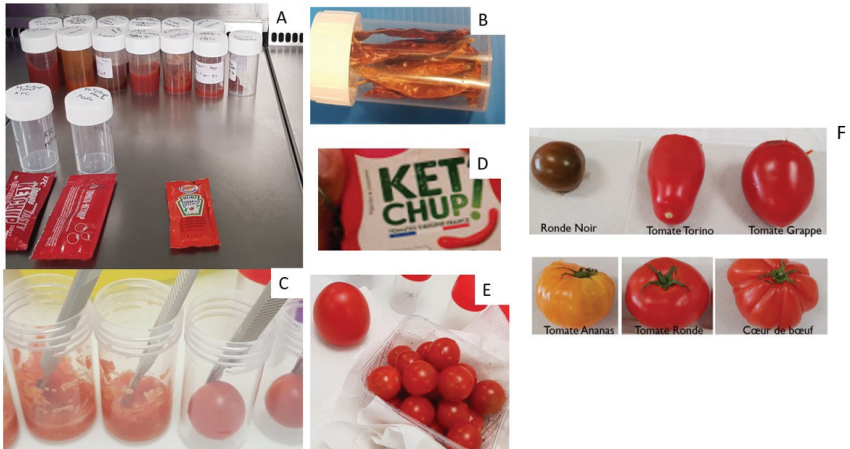


Figure 23: Collected sample types involved in the study

A and D: ketchup samples. B: Dry chili samples used as PMMoV control samples. C and E: Fresh tomato fruits (tomatoes bought from supermarket Casino and Lidl). F: Fresh bought from tomatoes from Terre de Provence greengrocer.



Figure 24

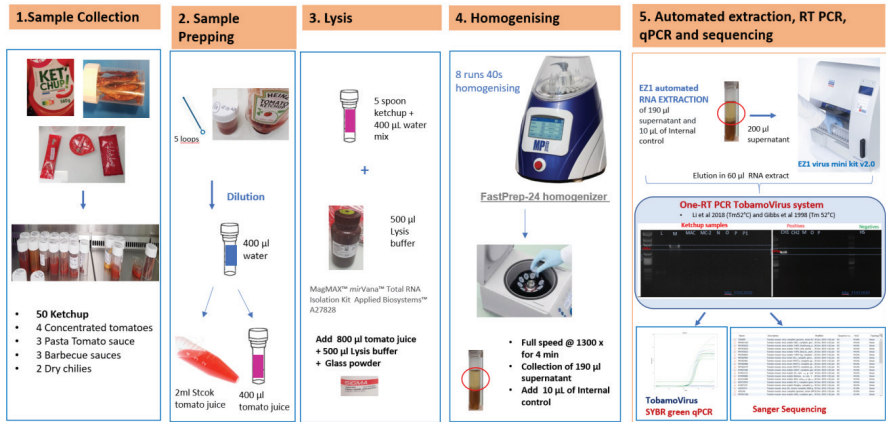


Figure 24: Processing steps of tomato sauces dry chili pepper samples from collection to analyses (RT-PCR and sequencing)

Step 1: Collected ketchup, tomato, and dry chili pepper samples. Step 2: sample dilution before the extraction. Step 3: sample lysis. Step 4: automated homogenisation of samples. Step 5: the automated extraction using the EZ1 automate (Qiagen) and one step RT-PCR results targeting tobamoviruses.

Figure 25

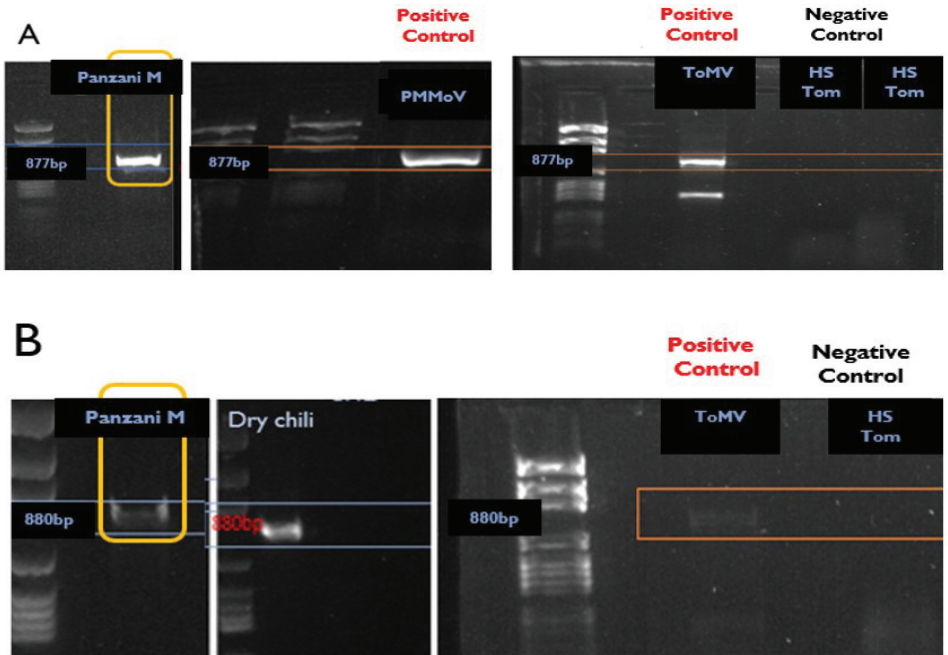


Figure 25: RT PCR results of positive Panzani sauce using two different primer sets

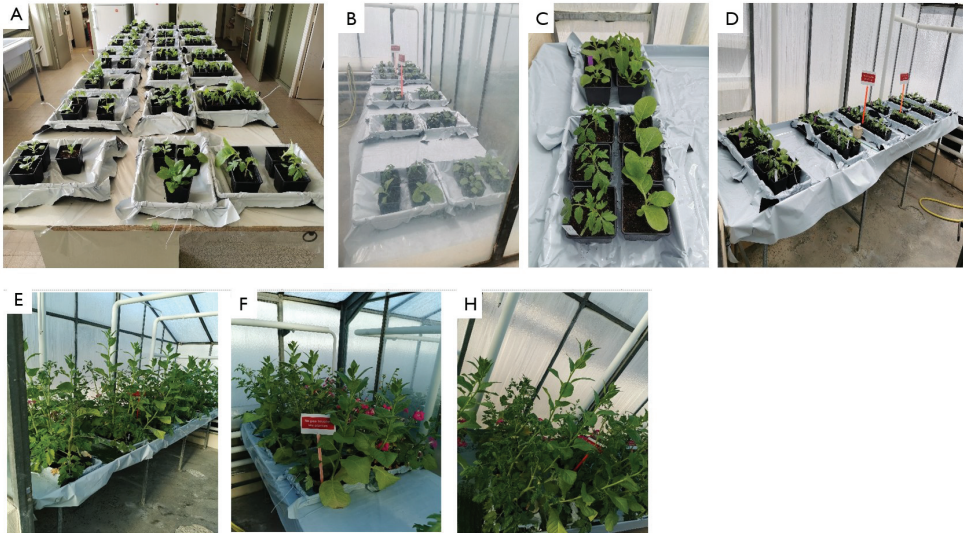
A: Samples detected by Li et al. primers. B: Samples detected by Gibbs et al. primers

Panzani M sample (PMMoV positive sample from tomato pasta Panzani).

Dry chilli: PMMoV positive control. ToMV: ToMV positive control. PMMoV: PMMoV

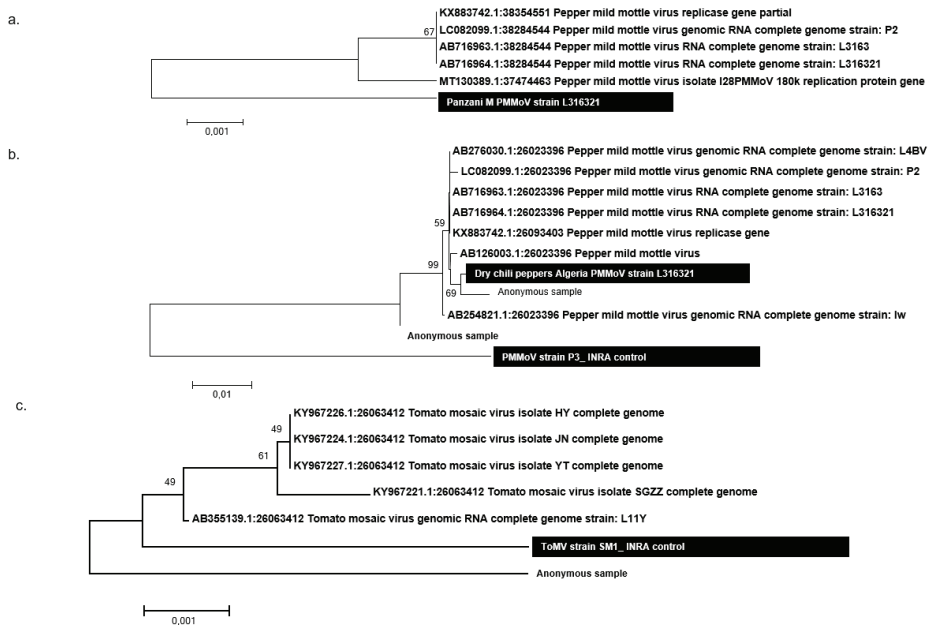
positive control. HS Tom: healthy tomato sample used as negative control.

**Figure 26**



**Figure 26: Inoculated plants using positive and negative ketchup and pasta Panzani sauces detected by RT-PCR and Sanger sequencing. A-D: inoculated plants on the first day of inoculation. E, F and H: inoculated plants 5 weeks after inoculation.**

**Figure 27**

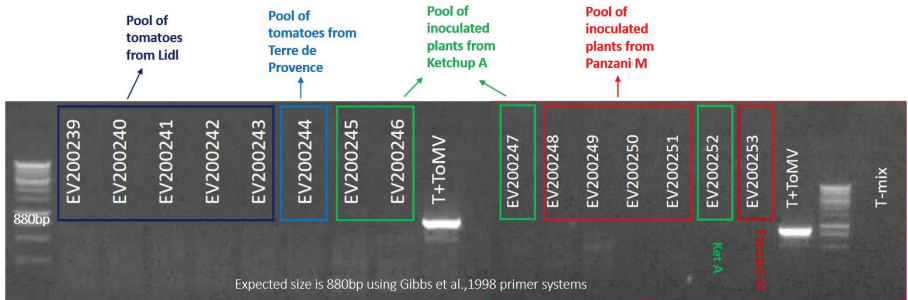


**Figure 27: Phylogenetic reconstructions based on the replicase gene of tobamoviruses**

Trees were built using PMMoV sequences obtained using the RT-PCR system of Li et al. (Li et al., 2018) (a) or of Gibbs et al. (Gibbs et al., 1998) (b) or from ToMV sequences obtained using the RT-PCR system of Li et al. (Li et al., 2018) (c), indicated by a black background and a white bold font, and best BLASTn hits from the NCBI GenBank nucleotide sequence database. Nucleotide alignments were performed using the MUSCLE software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). The evolutionary history was inferred in the MEGA6 software (<http://www.megasoftware.net/>) using the Neighbor-Joining method and the Kimura 2-parameter method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch

lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree; the scale bars indicate the number of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values >50% are labelled on the tree.

**Figure 28**



**Figure 28: Agarose gel electrophoresis of RT-PCR results of RNA extracts from pool of (fresh tomatoes pool, pool of RNA extracts) on inoculated host sensitive plants**

EV200252 : Ket A ie ToMV positive, undiluted ketchup sample); EV200253 : Panzani M ie PMMoV positive, undiluted tomato pasta Panzani). EV200239, EV200240, EV200241, EV200242 and EV200243: each samples correspond to a pool of 5 tomato fruits from Lidl supermarket); EV200244: pool of 6 heirloom tomatoes from Terre De Provence grocergreen ). EV200245: pool of 2 tomato *monalbo* plants inoculated with 2 dilutions (1:5 and 1:10) of Ket A. EV200246: pool of 2 *Nicotiana tabacum L. cv. Samsun* plants inoculated with 2 dilutions (1:5 and 1:10) of KetA. EV200247: pool of 2 *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with 2 dilutions (1:5 and 1:10) of KetA. EV200248: pool of 2 tomato *Solanum lycopersicum Monalbo* plants inoculated with Panzani M. EV200249: pool of 2 *Nicotiana tabacum L. cv. Samsun* plants inoculated with Panzani M. EV200250: pool of 2 *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with Panzani M.

T+ToMV : ToMV positive control. T-mix: RT-PCR negative control

**Table 2.**

**Table 2 : BLAST results of positive samples**

Sample identification	Sample type	BLAST results	NCBI accession number	Percentage of identity	Primer system
Panzani M	Panzani Pasta sauce	PMMoV strain: L3-16321	AB716964.1	95.69 %	Gibbs et al, 1998 & Li et al, 2018
Ketchup A	Ketchup sauce	ToMV isolate GW1	MH507165.1	91.57 %	Li et al, 2018

**Table 3.**

**Table 3: Number of tobamovirus-susceptible plant species inoculate with different dilutions of tobamovirus positive ketchup and pasta Panzani samples**

Plants	Positive Ketchup samples			Positive Panzani sauce samples			Negative Ketchup samples			Negative Panzani sauce samples			Total inoculated plants
	KetA 1:5	KetA 1:10	KetA 1:20	Panzani M 1:5	Panzani M 1:10	Panzani M 1:20	KetA 1:5	KetA 1:10	KetA 1:20	Panzani M 1:5	Panzani M 1:10	Panzani M 1:20	
<i>Monalbo</i>	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	30
<i>Samsun</i>	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	30
<i>Benthamiana</i>	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	30
<i>Yolo wonder</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	9
<b>Inoculum</b>	■ = Plants tested by RT-PCR 5- weeks after inoculation												

**KetA** (ToMV positive, Ketchup) **Panzani M** (PMMoV positive, tomato pasta Panzani); **J** (ToMV negative, Ketchup); **P1** (ToMV negative, tomato pasta Panzani). **Three dilutions of each sample at 1:5; 1:10 and 1:20** were used for inoculations of susceptible plants.



## References

- Aguado-García, Y., Taboada, B., Morán, P., Rivera-Gutiérrez, X., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximénez, C., Arias, C.F., 2020. Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx and gut of infants during their first year of life. *Sci. Rep.* 10, 13595. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>
- ANSES/LSV/MA034 - Version 2, n.d. 20.
- Balique, F., Colson, P., Raoult, D., 2012. Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers. *J. Clin. Virol.* 55, 374–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.012>
- Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.-J., Berbis, P., Lecoq, H., Harlé, J.-R., Berland, Y., Raoult, D., 2010. Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. *PLOS ONE* 5, e10041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010041>
- de Bernardis, E., Busà, L., 2020. A putative role for the tobacco mosaic virus in smokers' resistance to COVID-19. *Med. Hypotheses* 143, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110153>
- Gibbs, A., Armstrong, J., Mackenzie, A.M., Weiller, G.F., 1998. The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridisation-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *J. Virol. Methods* 74, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00070-6)
- Hamamoto, H., Watanabe, Y., Kamada, H., Okada, Y., 1997. Amino acid changes in the putative replicase of tomato mosaic tobamovirus that overcome resistance in Tm-1 tomato. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 2), 461–4. [---

195 | Page](https://doi.org/10.1099/0022-Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., Li, F., 2018a. Detection of</a></p></div><div data-bbox=)

- tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *J. Virol. Methods* 259, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012>
- Liu, R., Vaishnav, R.A., Roberts, A.M., Friedland, R.P., 2013. Humans Have Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. *PLOS ONE* 8, e60621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060621>
- Smith, R.L., Lawrence, J., Shukla, M., Singh, M., Li, X., Xu, H., Gardner, K., Nie, X., 2018. First Report of *Coleus blumei* viroid 5 and Molecular Confirmation of *Coleus blumei* viroid 1 in Commercial *Coleus blumei* in Canada. *Plant Dis.* 102, 1862–1862. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0055-PDN>
- Webster, C.G., Roskopf, E.N., Lucas, L., Mellinger, H.C., Adkins, S., 2014. First Report of Tomato mottle mosaic virus Infecting Tomato in the United States. *Plant Health Prog.* 15, 151–152. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0023>



# PROJET V



# L'agent Delta : un agent viroid-like pathogène chez l'homme



## Introduction

En complément de mes recherches de nouveaux agents viroïde-like chez l'homme, J'ai été impliqué dans deux travaux portant sur l'agent Delta, pour lesquels j'ai particulièrement réalisé l'analyse phylogénétique pour deux cas d'infections. L'agent Delta est l'agent causal de l'hépatite Delta chez l'Homme (Rizzetto and Stroffolini, 2021 ; Rizzetto et al., 1977 ; Magnius et al., 2018. Il est présent en co-infection dans environ 5% des hépatites B (Zhang et al., 2021). Il n'est pathogène qu'en cas de co-infection par le virus de l'hépatite B dont il utilise l'enveloppe pour l'infection des hépatocytes et sa propagation, et il a été classé comme virus satellite ou virus dépendant du VHB (Botelho-Souza et al., 2017 ; Wille et al., 2018). La co-infection par l'agent delta, de manière inappropriée nommé virus de l'hépatite delta (HDV), accélère la progression de l'hépatite chronique par rapport à l'infection par le virus de l'hépatite B seul (Zhang et al., 2021). L'ARN viral de l'agent Delta ne code que pour deux protéines, les petit (S-HDAg, p24) et grand (L-HDAg, P27) antigènes delta (Magnius et al., 2018). Les deux protéines sont impliquées respectivement dans la réplication et l'assemblage du virus (Tseng et al., 2009). Ces deux nucléoprotéines associées à l'ARN génomique sont enveloppées et protégées par l'enveloppe du virus de l'hépatite B.

Un lien a été rapporté entre les viroïdes et l'agent Delta (Elena et al., 1991 ; Balique et al., 2015). Tous deux partagent des similitudes : génomes ARN circulaires à simple brin, avec des structures en tige-boucle, et un haut niveau d'auto-complémentarité. L'ARN de l'agent Delta n'est que 4 à 7 fois plus long que celui des viroïdes, avec environ 1,7 kilobases (Magnius et al., 2018). De plus, l'agent delta et les viroïdes partagent le mode de réplication de leur ARN génomique par cercle roulant (Balique et al., 2015; Lasda et al., 2014). Par ailleurs, l'ARN de l'agent Delta contient un ribozyme. Il a été suggéré que l'agent Delta pourrait avoir évolué à partir de la fusion



de deux types d'ARN: un ARN de viroïde contenant la séquence d'un ribozyme et la séquence codante de l'ARN de l'antigène Delta, dont il a été proposé qu'il puisse avoir pour origine une protéine appelée protéine A qui interagit avec l'antigène delta (DIPA), présente dans les tissus humains (Elena et al., 1991 ; Brazas et al., 1996 ; Robertson et al., 1996 ; Taylor et al., 2010). Ces données posent la question de l'expansion des viroïdes, au travers de l'agent de l'hépatite delta humaine, au règne animal.

L'agent Delta est transmissible expérimentalement aux mammifères non humains tels que les chimpanzés et les marmottes, en présence de son virus auxiliaire (Magnius et al., 2018). Jusqu'en 2018, les deltavirus étaient inconnus chez d'autres hôtes que les humains (Szirovicza et al., 2020). Depuis, deux travaux de méta-transcriptomiques ont identifié les génomes de deltavirus chez les canards (Wille et al., 2018) et les serpent (Szirovicza et al., 2020 ; Hetzel et al., 2019). L'existence de deltavirus très divergents de l'agent Delta a aussi été révélée chez divers autres animaux incluant des rongeurs (Paraskevopoulou et al., 2020), des poissons (Chang et al., 2019), des amphibiens (Chang et al., 2019), ou des termites (Chang et al., 2019). De plus, contrairement au deltavirus humain, le deltavirus des rongeurs ne semble pas nécessiter une co-infection par un virus auxiliaire (Paraskevopoulou et al., 2020), et la répllication du deltavirus du serpent a été obtenue dans des cellules de boa constrictor surinfectées par des reptarenavirus et des hartmanivirus, ce qui suggère que les deltavirus peuvent probablement utiliser plusieurs virus auxiliaires différents (Szirovicza et al., 2020). Par ailleurs, il a été rapporté que l'antigène delta du deltavirus du serpent était fortement exprimé dans d'autres cellules, y compris les cellules cérébrales, les cellules épithéliales tubulaires rénales, les cellules épithéliales pulmonaires et les leucocytes, ce qui suggère que le deltavirus du serpent pourrait présenter un tropisme non uniquement pour les cellules hépatiques (Hetzel et al., 2019). Enfin, une recherche d'ARN auto-clivés dans le génome humain a détecté une séquence de type agent Delta dans un gène humain (CPEB3), qui appartient à une

famille de gènes qui régulent la polyadénylation de l'ARN messager (Salehi-Ashtiani et al., 2006). Au total, ces données suggèrent que les deltavirus sont plus communs et divers qu'on ne le pensait jusque très récemment. Leurs caractéristiques les rattachent à notre sujet de thèse qui s'intéresse aux putatifs agents viroïde-like chez l'Homme.

L'avènement au 21<sup>ème</sup> siècle des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) a considérablement amélioré la détection et la caractérisation des séquences microbiennes et virales. Initialement utilisé lors d'études sur les échantillons environnementaux, animaux et humains, le NGS a été introduit plus récemment dans les laboratoires de microbiologie et virologie clinique (Astbury et al., 2020; Colson et al., 2020; Mitchell and Simner, 2019; Moon et al., 2018; Zhong et al., 2021). Ses exigences techniques, sa durée de réalisation et son coût sont ainsi désormais compatibles avec une utilisation diagnostique. Le NGS permet d'identifier les agents infectieux sur la base de génomes complets et pas seulement de gènes ou de fragments de gènes. De plus, la technologie Oxford Nanopore (ONT) permet une vitesse de production de séquences extrêmement prometteuse pour une utilisation en diagnostic (Moon et al., 2018; Quick et al., 2017). L'ONT permet le séquençage de molécules d'ADN ou d'ARN natives, dont la taille n'est pas borné par leur séquençage. Ces molécules sont amenées au contact puis transférées à travers les pores nanométriques d'une matrice, une seule molécule à la fois. Au fur et à mesure que l'ADN ou l'ARN traverse le pore, les capteurs détectent des changements du courant ionique spécifiques de chaque nucléotide, ce qui permet de déterminer la séquence d'acide nucléique. Alors que le NGS est le plus souvent utilisé après un enrichissement spécifique de la cible, une autre étape consiste à le réaliser directement à partir d'échantillons cliniques après l'extraction d'acide nucléique. Nous avons obtenu par ONT un génome partiel de l'agent Delta et un génome complet du VHB directement à partir de l'échantillon de plasma d'un patient, c'est-à-dire sans amplification préalable par PCR. Le NGS a jusqu'à présent été utilisé pour obtenir des séquences de l'agent Delta et du VHB, mais le plus souvent après un enrichissement de la cible, ce qui notamment, nécessite plus de temps, et signifie que l'on doit savoir ce que l'on

veut séquencer (Astbury et al., 2020). Par rapport au séquençage de population de Sanger, le NGS peut fournir des informations sur les mutations, les délétions et les insertions pour tous les gènes viraux simultanément, ainsi que pour les régions intergéniques, et donc permettre une évaluation plus complète et plus approfondie des génomes viraux. Aussi, le NGS directement à partir d'extraits d'ADN ou d'ARN sans amplification par PCR peut permettre de détecter simultanément plusieurs agents infectieux non ciblés comme nous l'avons réalisé, avec le séquençage simultanément de l'ARN de l'agent Delta et de l'ADN du VHB. Une telle approche « ouverte », sans PCR, et rapide devrait optimiser le diagnostic des infections.

Bien que l'infection à HDV puisse être évitée grâce à la vaccination contre le VHB qui est nécessaire à sa propagation (Zhang et al., 2021), il n'y avait jusqu'à récemment qu'un seul médicament, l'interféron pégylé alpha-2a ou -2b (Brancaccio et al., 2019 ; Zhang et al., 2021) pour le traitement de l'hépatite delta. Cependant, l'interféron alpha pégylé présente une toxicité importante (Zhang et al., 2021). Le taux de réponse virologique en fin de traitement et suivant son arrêt est faible avec ce traitement : il est observé un échec thérapeutique le plus souvent chez plus d'un tiers des patients, y compris lorsque ce médicament est associé à l'adéfovir, à l'entécavir ou au ténofovir qui contrôlent la réplication du VHB (Brancaccio et al., 2019 ; Zhang et al., 2021). Par conséquent, la disponibilité d'autres médicaments efficaces sur la réplication du deltavirus humain est nécessaire. Le béluvirtide est un lipopeptide synthétique N-myristoylé d'une longueur de 47 acides aminés dérivé du domaine préS1 de la grande protéine de surface du VHB (Brancaccio et al., 2019 ; Zhang et al., 2021; Cheng et al., 2021). C'est un inhibiteur d'entrée qui peut entrer en compétition avec à la fois l'agent Delta et le VHB pour le polypeptide co-transportant du taurocholate de sodium (NTCP), qui a été identifié comme le récepteur de ces deux agents d'hépatite, et il peut par conséquent bloquer l'infection des hépatocytes (Cheng et al., 2021). Le béluvirtide (2 mg/jour) a été associé dans un essai clinique à une réduction de 1,7 et 2,8 log<sub>10</sub>copies/mL de la charge d'ARN Delta, respectivement à 6 et 12 mois de traitement

(Bogomolov et al., 2018 ; Wedemeyer et al., 2020 ; Zhang et al., 2021).

Le nombre de cas rapportés de traitement hors protocole (dans la vie réelle) de l'hépatite delta par le béluvirtide est actuellement très limité. Nous avons étudié et décrit le cas d'un patient co-infecté par l'agent Delta et le VHB qui a été traité par le béluvirtide combiné au ténofovir et à l'interféron alpha-2a pégylé. Ce cas montre un échec virologique du traitement par le béluvirtide à 2 mg en association avec l'interféron alpha-2a pégylé et le ténofovir, avec une réponse initiale au 3<sup>ème</sup> mois (-2,5 log<sub>10</sub>copies/mL) puis un rebond virologique au 6<sup>ème</sup> mois. Cet échec pourrait être au moins en partie lié à la réduction de la posologie de l'interféron pégylé dès le 4<sup>ème</sup> mois, avant l'arrêt complet de ce médicament au 8<sup>ème</sup> mois en raison d'une thrombocytopenie. L'ADN du VHB a lui atteint un niveau indétectable sous béluvirtide alors qu'il était systématiquement détectable entre février 2016 et décembre 2019, bien qu'à un niveau faible (moyenne  $\pm$  écart-type,  $2,6 \pm 0,4$  log<sub>10</sub>UI / L (intervalle, 1,6-2,9)). De plus, le taux moyen d'alanine aminotransférase, le marqueur de la cytolyse hépatique était de  $318 \pm 206$  UI/L (78-714) entre février 2016 et décembre 2019 puis de  $60 \pm 15$  UI/L (36-81). Dans l'ensemble, les données antérieures indiquent que l'hépatite delta reste une maladie difficile à guérir, et même à contrôler virologiquement avec l'arsenal de médicaments actuellement proposé, y compris en administrant du béluvirtide. Il est possible d'administrer une dose plus élevée (5 mg ou 10 mg) qui peut améliorer la réponse virologique. Par ailleurs, la connaissance de la toxicité de ce médicament reste limitée. Finalement, la découverte d'autres deltavirus depuis 2018 chez divers animaux dont certains mammifères (Chang et al., 2019), pourrait indirectement contribuer à acquérir une meilleure connaissance de l'agent Delta et sa sensibilité aux médicaments.

## References

- Balique F., H. Lecoq, D. Raoult, *et al.* 2015. Can Plant Viruses Cross the Kingdom Border and Be Pathogenic to Humans ? *Viruses* **7**: 2074–2098.
- Elena S.F., J. Dopazo, R. Flores, R., *et al.* 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis delta virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **4**.
- Rizzetto M. & T. Stroffolini. 2021. Forty-Five Years after the Discovery of the Hepatitis D Virus: Where Do We Stand? *Viruses* **13**: 555.
- Rizzetto M., M.G. Canese, S. Aricò, *et al.* 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18** : 997–1003.
- Magnius L., J. Taylor, W.S. Mason, *et al.* 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile : Deltavirus. *J. Gen. Virol.* **99** : 1565–1566.
- Tseng C.-H. & M.M.C. Lai. 2009. Hepatitis Delta Virus RNA Replication. *Viruses* **1** : 818–831.
- Botelho-Souza L.F., M.P.A. Vasconcelos, A. de O. dos Santos, *et al.* 2017. Hepatitis delta : virological and clinical aspects. *Virol. J.* **14**: 177.
- Wille M., H.J. Netter, M. Littlejohn, *et al.* 2018. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses* **10**: 720.
- Lasda E. & R. Parker. 2014. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* **20**: 1829–1842.
- Brazas R. & D. Ganem. 1996. A Cellular Homolog of Hepatitis Delta Antigen: Implications for Viral Replication and Evolution. *Science* **274**: 90–94.
- Robertson H.D. 1996. How Did Replicating and Coding RNAs First Get Together? *Science* **274**: 66–67.
- Taylor J. & M. Pelchat. 2010. Origin of hepatitis  $\delta$  virus. *Future Microbiol.* **5**: 393–402.

- Szirovicza L., U. Hetzel, A. Kipar, *et al.* 2020. Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles. *mBio* **11**: e03250-19.
- Hetzel U., L. Szirovicza, T. Smura, *et al.* 2019. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *mBio* **10**: e00014-19.
- Paraskevopoulou S., F. Pirzer, N. Goldmann, *et al.* 2020. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**: 17977-17983.
- Chang W.-S., J.H.-O. Pettersson, C. Le Lay, *et al.* 2019. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* **5**: vez021.
- Salehi-Ashtiani K., A. Lupták, A. Litovchick, *et al.* 2006. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* **313**: 1788–1792.
- Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, *et al.* Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol* 2016;65:490–498.
- Brancaccio G, Gaeta GB. Treatment of chronic hepatitis due to hepatitis B and hepatitis delta virus coinfection. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Dec;54(6):697-701. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.012. Epub 2019 Sep 18.
- Chang W.-S., J.H.-O. Pettersson, C. Le Lay, Shi M, Lo N, Wille M, *et al.* 2019. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* **5**: vez021.
- Cheng D, Han B, Zhang W, Wu W. Clinical effects of NTCP-inhibitor myrcludex B. *J Viral Hepat.* 2021 Feb 17. doi: 10.1111/jvh.13490. Epub ahead of print.
- Kang C, Syed YY. Bulevirtide: First Approval. *Drugs.* 2020 Oct;80(15):1601-1605. doi: 10.1007/s40265-020-01400-1. PMID: 32926353.
- Petit PR, Borentain P, Aherfi S, Gérolami R, Colson P. Hepatitis Delta recurrence post-liver transplantation in absence of detectable hepatitis B surface antigen and hepatitis B virus DNA in peripheral blood. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2020 Jun;44(3):e41-e44.

- Taylor JM. Infection by Hepatitis Delta Virus. *Viruses*. 2020 Jun 16;12(6):648. doi: 10.3390/v12060648. PMID: 32560053; PMCID: PMC7354607.
- Trivedi J, Mohan M, Byrareddy SN. Drug Repurposing Approaches to Combating Viral Infections. *J Clin Med*. 2020 Nov 23;9(11):3777.
- Wedemeyer H, Bogomolov P, Blank A, Allweiss L, Dandri M, Bremer B, et al. Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J Hepatol* 2018;68:S3.
- Zhang Z, Urban S. New insights into HDV persistence: The role of interferon response and implications for upcoming novel therapies. *J Hepatol*. 2021 Mar;74(3):686-699.
- Mitchell SL and Simner PJ. Next-generation sequencing in clinical microbiology: are we there yet? *Clin Lab Med* 2019; 39:405-18.
- Astbury S, Costa Nunes Soares MM, Peprah E, King B, Jardim ACG, Shimizu JF, et al. Nanopore sequencing from extraction-free direct PCR of dried serum spots for portable hepatitis B virus drug-resistance typing. *J Clin Virol* 2020; 129:104483.
- Moon J, Jang Y, Kim N, Park WB, Park KI, Lee ST, et al. Diagnosis of *Haemophilus influenzae* pneumonia by Nanopore 16S amplicon sequencing of sputum. *Emerg Infect Dis* 2018; 24:1944-6.
- Colson P, Borentain P, Ravaux I, Aherfi S. Hepatitis B virus genomics knocking at the door of routine diagnostic laboratories. *J Infect Dis* 2020 ;221:1026-9.
- Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of next generation sequencing in laboratory medicine. *Ann Lab Med* 2021; 41:25-43.
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes
- Colson P, Lagier JC, Baudoin JP, Bou Khalil J, La Scola B, Raoult D. Ultrarapid diagnosis, microscope imaging, genome sequencing, and culture isolation of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39:1601-3.

Petit PR, Borentain P, Aherfi S, Gérolami R, Colson P. Hepatitis Delta recurrence post-liver transplantation in absence of detectable hepatitis B surface antigen and hepatitis B virus DNA in peripheral blood. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2020;44: e41-4.

McNaughton AL, Roberts HE, Bonsall D, de Cesare M, Mokaya J, Lumley SF, et al. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Sci Rep* 2019; 9:7081.





# Travail de Recherche 1



## Article de Recherche 1

# Concurrent Nanopore next-generation sequencing of hepatitis B and delta virus genomes directly from a patient plasma sample

Philippe Colson, Céline Boschi, **Jessica Bengone-Abogourin**, Ludivine Brechard, Anne Motte, Isabelle Allemand



**Article accepté dans Annals of Clinical Medicine**



**Type of article: Letter to the Editor**

**Full-length title:**

Concurrent Nanopore next-generation sequencing of hepatitis B and delta virus genomes directly from a patient plasma sample.

Short title (for the running head): Direct HBV/HDV next-generation sequencing

**Author list:** Philippe COLSON<sup>1,2\*</sup>, Céline BOSCHI<sup>1,2</sup>, **Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN**<sup>1,2</sup>, Ludivine BRECHARD<sup>1</sup>, Anne MOTTE<sup>1,2</sup>, Isabelle ALLEMAND<sup>3</sup>

**Affiliations:**

1 Aix-Marseille Univ., Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), MEPHI, 27 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France;

2 IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005Marseille, France;

3 Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), service d'Hépatogastro-Enterologie, 264 rue Saint-Pierre, 13005 Marseille, France

\* Corresponding author: Philippe Colson, IHU - Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Tel.: +33 413 732 401, Fax: +33 413 732 402; email:philippe.colson@ap-hm.fr

Key words: Hepatitis B virus; Delta agent; next-generation sequencing; genome; Oxford Nanopore; real-time genomics

Figure: 1; Tables: 0; References: 6



## To the Editor:

The advent during the 21<sup>st</sup> century of next-generation sequencing (NGS) techniques has considerably improved the detection and characterization of microbial and viral sequences. Primarily used for research to study environmental, animal and human samples, NGS has been more recently introduced in clinical microbiology and virology laboratories (Astbury et al., 2020; Colson et al., 2020a; Mitchell and Simner, 2019; Moon et al., 2018; Zhong et al., 2021). Its technical requirements, processing time and cost are now compatible with diagnostic use. NGS allows identifying infectious agents based on complete genomes and not only genes or genes fragments. In addition, the Oxford Nanopore technology (ONT) permits extremely promising sequence production speed (Moon et al., 2018; Quick et al., 2017). ONT allows single-molecule sequencing of fragments of DNA or RNA. Native DNA or RNA molecules are pulled through nanoscale pores, only one molecule at a time. As the DNA or RNA passes through the pore, sensors detect changes in the ionic current that are specific of each passing nucleotide, which allows to determine the nucleic acid sequence. While NGS is most often used following specific target enrichment, another step is to perform it directly from clinical samples post-nucleic acid extraction. We recently used this latter approach in our clinical microbiology/virology laboratory to detect and characterize the genomes of hepatitis B virus (HBV) by Illumina NGS and of SARS-CoV-2 by both Illumina and ONT NGS (Colson et al., 2020b; Petit et al., 2020). Here we describe NGS of a full-length HBV genome and a partial Delta agent genome directly from a same patient's plasma sample with ONT.

A 27-year-old male student was sampled in June 2020 to monitor his HBV and Delta agent infections diagnosed in October 2018 during a systematic screening. He is originating from the Republic of Chad and lived in Morocco between 2011 and 2012 then in France since 2015. He was not aware of viral hepatitis in his family. It is unknown if he was coinfecting with hepatitis B and Delta agent or experienced Delta

agent surinfection on chronic hepatitis B. In November 2018, liver ultrasound testing was normal, transient elastography showed no liver fibrosis, and the patient was clinically asymptomatic. In June 2020, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels were 87 and 115 IU/L, respectively (upper normal values, 50 IU/L). Serological testing showed hepatitis B surface (HBs) antigen (Ag)-positivity, total anti-HB core antibody (Ab)-positivity, anti-HBsAb-negativity, HBeAg-positivity, and anti-HBeAb-negativity (Architect assays, Abbott Diagnostics, Mannheim, Germany). Serum HBV DNA load was 8.0 log<sub>10</sub> IU/mL (NeuMoDx HBV Quant assay, Qiagen, Courtaboeuf, France). Anti-Delta agent IgG and IgM testing (Euroimmun, Lubeck, Germany) were both positive, and Delta agent RNA load determined by an in house assay as previously described (McNaughton et al., 2019) was 9.6 log<sub>10</sub> copies/mL. We used ONT as previously described (Petit et al., 2020) to obtain sequences from the HBV and Delta agent genomes directly from the patient's plasma sample on a GridION X5 instrument (ONT Ltd., Oxford, UK). Briefly, DNA/RNA were extracted from 200 µL of plasma using the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 on a BioRobot EZ1 workstation (Qiagen), and RNA was reverse transcribed using SuperScript IV (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) before cDNA second strand synthesis with Klenow Fragment DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). DNA was then purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France) and sequenced using a nanopore ligation sequencing kit on a GridION X5 instrument (Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK). Genome consensus sequences were generated with the CLC Genomics workbench v.7 (<https://digitalinsights.qiagen.com/>) by mapping on HBV and HDV genomes GenBank Accession no. M32138 and M84917, respectively, with 0.85% similarity and 50% coverage as thresholds. A total of 41 (average length=918 nucleotides) and 3 (average length=490 nucleotides) reads were detected as belonging to HBV and Delta agent, respectively. This generated full-length HBV genome and partial Delta agent genomes with a size of 3,179 and 326 nucleotides, respectively (available from <https://www.mediterranee-infection.com/acces-ressources/donnees->

pour-articles/hbv-hdv-ngs/). Phylogenetic analyses identified HBV of genotype D and Delta agent of genotype 1 (Figure 1). Mean diversity per nucleotide position of the HBV genome was  $5.4 \pm 9.0\%$ ; mean coverage was  $8.9 \pm 2.9$ . Neither anti-HBV drug resistance mutations nor HBsAg escape variants were detected. A 570-nucleotide long sequence corresponding to the Delta Ag-encoding gene and generated by Sanger population sequencing as previously described (McNaughton et al., 2019) was clustered with that obtained using ONT in the phylogenetic analysis (Figure 1).

We report here for the first time to our knowledge the concurrent detection and obtention of sequences from HBV and Delta agent, including full HBV genome recovery, on a same day and directly from plasma post-nucleic acid extraction. Illumina and/or ONT NGS were previously used to obtain HBV or Delta agent sequences, but this was most often preceded by target enrichment, which requires more time (Astbury et al., 2020) [2, 10]. As compared to Sanger population sequencing, NGS can provide information on mutations, deletions and insertions for all viral genes simultaneously, and also for intergenic regions, and therefore allow a more comprehensive and deeper assessment of viral genomes. Such data will contribute gaining a better knowledge of the genome features associated with various clinical settings. Regarding HBV infection, this includes acute liver failure, drug resistance, immune escape, or viral reactivation. In addition, performing NGS directly from DNA or RNA extracts without PCR amplification, as this was done for the present case, is simpler and faster, and can allow detecting simultaneously several infectious agents not targeted. Furthermore, NGS using ONT can allow fast viral genome detection and characterization, in a timeframe that is highly appropriate for clinical diagnosis purpose. Thus, although still in its infancy with necessary improvements in sensitivity and precision, such a fast PCR-free versatile and open approach should optimize the diagnosis of infections in the near future.

## **Ethics**

All data have been generated as part of the routine work at Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (Marseille university hospitals), and this study results from routine standard clinical management. Access to the patients' biological and registry data issued from the hospital information system was approved by the data protection committee of Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (APHM) and was recorded in the European General Data Protection Regulation registry under number RGPD/APHM 2019-73. This study has been approved by our institution's ethics committee (N°2019-001).

## **Author contributions**

Conceived and designed the study: PC. Contributed materials/analysis tools: PC, CB, JGBA, LB, IA, AM. Analyzed the data: PC, CB, JBA. Wrote the paper: PC, IA.

## **Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest to declare. Funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; and preparation, review, or approval of the manuscript.

## **Funding**

This work was supported by the French Government under the "Investments for the Future" program managed by the National Agency for Research (ANR), Méditerranée-Infection 10-IAHU-03 and was also supported by Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and European funding FEDER PRIMMI (Fonds Européen de Développement Régional-Plateformes de Recherche et d'Innovation Mutualisées Méditerranée Infection), FEDER PA 0000320 PRIMMI.

## Figure Legend

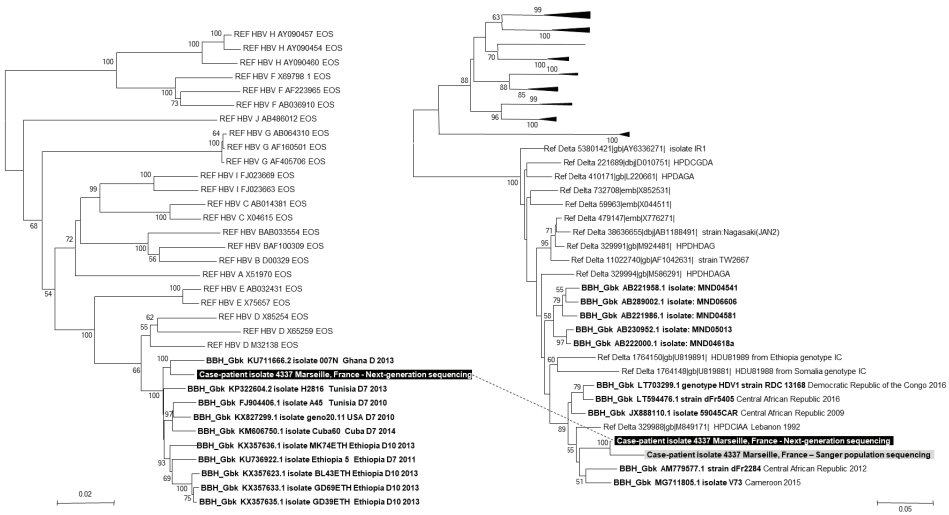
### Figure 1. Phylogenetic trees based on hepatitis B virus genome (A) and Delta antigen encoding gene (B)

The ten sequences with the highest BLAST scores recovered from the NCBI GenBank nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), indicated by BBH GbK for best blast hit and genBank and by a black bold font, were incorporated in the phylogeny reconstructions, in addition to reference sequences, indicated by Ref for Reference, for HBV or Delta agent genotypes. Nucleotide alignments were performed using the MUSCLE software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). The evolutionary history was inferred in the MEGA6 software (<http://www.megasoftware.net/>) using the Neighbor-Joining method and the Kimura 2-parameter method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree; the scale bars indicate the number of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values >50% are labeled on the tree.

**A: Phylogenetic tree based on hepatitis B virus genome sequences. There was a total of 3252 positions in the final dataset.**

**B: Phylogenetic tree based on the Delta antigen encoding gene.** The fragment of gene encoding for the hepatitis Delta virus (HDV) antigen was 343-nucleotide long and corresponded to nucleotides 824-1,154 of the HDV genome GenBank accession no. AM779577.1. HDV sequence obtained by Sanger population from the case-patient's plasma are indicated by a white bold font and a black background.

**Figure 1**



## 1 References

- 2 1. Mitchell SL, Simner PJ. Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology:  
3 Are We There Yet? Clin Lab Med 2019;39:405-18.
- 4 2. Astbury S, Costa Nunes Soares MM, Peprah E, King B, Jardim ACG, Shimizu JF,  
5 et al. et al. Nanopore sequencing from extraction-free direct PCR of dried serum  
6 spots for portable hepatitis B virus drug-resistance typing. J Clin Virol  
7 2020;129:104483.
- 8 3. Moon J, Jang Y, Kim N, Park WB, Park KI, Lee ST, et al. Diagnosis of *Haemophilus*  
9 *influenzae* pneumonia by Nanopore 16S amplicon sequencing of sputum. Emerg  
10 Infect Dis 2018;24:1944-6.
- 11 4. Colson P, Borentain P, Ravaux I, Aherfi S. Hepatitis B virus genomics knocking  
12 at the door of routine diagnostic laboratories. J Infect Dis 2020;221:1026-1029.
- 13 5. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation  
14 Sequencing in Laboratory Medicine. Ann Lab Med 2021;41:25-43.
- 15 6. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al.  
16 Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other  
17 virus genomes directly from clinical samples. Nat Protoc 2017;12:1261-76.
- 18 7. Colson P, Lagier JC, Baudoin JP, Bou Khalil J, La Scola B, Raoult D. Ultrarapid  
19 diagnosis, microscope imaging, genome sequencing, and culture isolation of  
20 SARS-CoV-2. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2020;39:1601-3.
- 21 8. Petit PR, Borentain P, Aherfi S, Gérolami R, Colson P. Hepatitis Delta recurrence  
22 post-liver transplantation in absence of detectable hepatitis B surface antigen and  
23 hepatitis B virus DNA in peripheral blood. Clin Res Hepatol Gastroenterol  
24 2020;44:e41-e44.
- 25 9. McNaughton AL, Roberts HE, Bonsall D, de Cesare M, Mokaya J, Lumley SF, et  
26 al. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B  
27 virus (HBV). Sci Rep 2019;9:7081-43524.

28

## Travail de Recherche 2





33

## **Article de Recherche**

34

35

36

37

**Hepatitis delta treatment with bulevirtide in real  
life: a case report.**

38

39

**Short title (for the running head): HDV treatment  
with bulevirtide**

40

41

42

43

**Marc-Antoine GIORDAN, Jessica Grace BENGONE-ABOGOURIN,  
Sarah AHERFI, Isabelle ALLEMAND, Philippe COLSON**

44

45

46

47

48 **Article à soumettre pour publication**



51

52

**TITLE PAGE**

53

54

**Type of article: Case report**

55

56

**Full-length title: Hepatitis delta treatment with bulevirtide in real life: a case report.**

57

58

**Short title (for the running head): HDV treatment with bulevirtide**

59

60

**Author list: Marc-Antoine GIORDAN<sup>1</sup>, Jessica Grace BENGONE ABOGOURIN<sup>1,2</sup>, Sarah AHERFI<sup>1</sup>, Isabelle ALLEMAND<sup>3</sup>, Philippe COLSON<sup>1,2\*</sup>**

61

62

63

**Affiliations:** <sup>1</sup> Aix-Marseille Univ., Institut de Recherche pour le Développement

64

(IRD), Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), MEPHI, 27 boulevard

65

Jean Moulin, 13005 Marseille, France; <sup>2</sup> IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard

66

Jean Moulin, 13005 Marseille, France

67

**\* Corresponding author:** Philippe Colson, IHU-Méditerranée Infection, 19-21

68

boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Tel.: +33 413 732 401, Fax: +33 413

69

732 402; email: philippe.colson@univ-amu.fr

70

71

**Key words:** Hepatitis Delta; bulevirtide; pegylated-interferon; tenofovir.

72

**Word count:** 1,093

73

**TEXT**



74 **Introduction**

75 Co-infection with hepatitis delta virus (HDV) accelerates the progression of chronic  
76 hepatitis compared to infection with hepatitis B virus (HBV) alone (Zhang et al., 2021).  
77 Although HDV infection can be prevented with vaccination against HBV that is  
78 required for its propagation (Zhang et al., 2021), there was until recently only one off-  
79 label drug, pegylated-interferon alpha-2a or -2b (Brancaccio et al., 2019; Zhang et al.,  
80 2021), for the treatment of hepatitis delta. The rate of virological response ( $\geq 2 \log_{10}$   
81 reduction of HDV RNA level at end of treatment) and of sustained virological  
82 response on treatment is low with this latter treatment, as in most cases it is observed  
83 in no more than one third of the patients, including when this drug is associated with  
84 adefovir, entecavir, or tenofovir disoproxil fumarate (TDF) that can control HBV  
85 replication (Brancaccio et al., 2019; Zhang et al., 2021). In addition, pegylated-  
86 interferon alpha has a substantial toxicity. Therefore, availability of other drugs  
87 efficient on HDV replication is needed. Bulevirtide is a synthetic N-myristoylated 47-  
88 amino-acid long lipopeptide derived from the preS1-domain of the large HBV surface  
89 protein (Brancaccio et al., 2019; Zhang et al., 2021; Cheng et al., 2021). It is an entry  
90 inhibitor that can compete with HBV for the sodium-taurocholate co-transporting  
91 polypeptide (NTCP), which has been identified as the HBV and HDV receptor and  
92 can block infection of hepatocytes by both viruses (Cheng et al., 2021). Two mg of  
93 beluvirtide daily were associated in a clinical trial with 1.7- and 2.8- $\log_{10}$ copies/mL  
94 reduction of HDV RNA load at 24 and 48 weeks of treatment, respectively  
95 (Bogomolov et al., 2018; Wedemeyer et al., 2020; Zhang et al., 2021). Here, we present  
96 the case of a patient co-infected with HBV and HDV who was treated with beluvirtide  
97 in addition to tenofovir and pegylated-interferon-alpha-2a.

98

99

100 **Case report**

101

102 The patient is a 36-year-old male originating from Georgia who was presented in  
103 February 2016 in our institution with liver cytolysis (alanine aminotransferase level  
104 (ALT), 698 IU/L; aspartate aminotransferase level (AST), 339 IU/L), which led to  
105 diagnose a co-infection with hepatitis B virus and the hepatitis delta virus (HDV).  
106 Hepatitis C and HIV serologies were negative. The patient was at pre-cirrhosis stage  
107 as transient elastography indicated fibrosis at Metavir stage 3 (12 kPa). HDV RNA  
108 load performed using an in house real-time reverse transcription-PCR assay as  
109 previously described (Petit et al., 2020) and HBV DNA load determined using the DxN  
110 Veris assay (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were 7.0 log<sub>10</sub>copies/mL and 1.8 IU/L,  
111 respectively. The HDV genotype was determined as 1A by Sanger population  
112 sequencing using in house procedures, as previously described (Petit et al., 2020). Due  
113 to the very low HBV DNA level, HBV genotype could not be determined. Between  
114 February 2016 and December 2019, the patient received pegylated-interferon alpha-2a  
115 then TDF, since January 2018. In 2017, transient elastography indicated fibrosis at  
116 Metavir stage 4 (20 kPa). In December 2019, HDV RNA load was 7.4 log<sub>10</sub>copies/mL,  
117 HBV DNA load was 2.6 log<sub>10</sub>IU/mL, and ALT was 81 IU/L (Figure 1). Treatment with  
118 bulevirtide was started in January 2020 at a dosage of 2 mg, in addition to TDF (245  
119 mg) and in combination with pegylated interferon-alpha-2a at a dosage of 180 µg.  
120 Pegylated interferon dosage was reduced to 135 µg in February 2020 due to a decrease  
121 in the platelet count from 117 to 57/mm<sup>3</sup>. Virological response was observed with a  
122 decrease in HDV RNA load to 4.9 log<sub>10</sub>copies/mL (-2.5 log<sub>10</sub>) at month three of  
123 treatment, and to 4.4 log<sub>10</sub>copies/mL (-3.0 log<sub>10</sub>) at month four. The dosage of pegylated  
124 interferon-alpha was further reduced to 90 µg due to thrombocytopenia (43 G/L).  
125 Thereafter, HDV RNA load re-increased to 5.5 log<sub>10</sub>copies/mL in July 2020 then  
126 remained high until April 2021, fluctuating between 5.7 and 7.7 log<sub>10</sub>copies/mL.  
127 Regarding HBV DNA, it reached undetectable levels in April 2020 then was

128 persistently undetectable until April 2021 except once when detected at  $1.1 \log_{10}$ IU/mL  
129 in June. Besides, ALT fluctuated on bulevirtide between 36 and 81 IU/L. Mid-  
130 September 2020, pegylated interferon-alpha was discontinued as the platelet count  
131 remained low (44G/L), and this was associated with a rise of the platelet count above  
132 90 G/L. In November 2020, liver ultrasound assessment showed a cirrhotic liver with  
133 finely irregular contours, without focal lesions, and signs of portal hypertension with  
134 dilation of the portal trunk. Clinical examination showed associated splenomegaly.  
135 Also, transient elastography showed progression of fibrosis (39 kPa). In April 2021, on  
136 TDF plus bulevirtide, HDV RNA load was  $7.7 \log_{10}$ copies/mL while HBV DNA was  
137 undetectable. ALT was 68 IU/L, and prothrombin index was 56%. No clinical side  
138 effect was noted during bulevirtide treatment; thrombocytopenia that was attributed  
139 to pegylated-interferon therapy.

140

## 141 **Discussion**

142 The number of case reports on HDV therapy with bulevirtide is currently very limited  
143 in the real life. The present case shows virological failure of HDV treatment with  
144 bulevirtide at 2 mg in combination with pegylated-interferon alpha-2a and TDF, with  
145 an initial response at month 3 ( $-2.5 \log_{10}$ copies/mL) then a virologic rebound at month  
146 6. This failure could be at least partly due to the reduction of pegylated-interferon  
147 dosage as soon as at month four, before drug discontinuation at month 8 due to  
148 thrombocytopenia. It is worthy to note that HBV DNA reached undetectability on  
149 bulevirtide whereas it was systematically detectable between February 2016 and  
150 December 2019, albeit at a low level (mean $\pm$ standard deviation,  $2.6\pm 0.4 \log_{10}$ IU/L  
151 (range, 1.6-2.9)). In addition, mean ALT was  $318\pm 206$  IU/L (78-714) between February  
152 2016 and December 2019 then  $60\pm 15$  IU/L (36-81). Recently, Loglio et al. reported that  
153 48 weeks and high-dose (10 mg) administration of bulevirtide was safe and effective  
154 in three patients (Loglio et al., 2021). HBV DNA was undetectable in the three cases



155 and HDV RNA decreased until undetectability in two cases and from 6.8 to 2.7  
156 log<sub>10</sub>copies/mL in the third case. These patients exhibited substantial increase of bile  
157 acids, which is attributed to beluvirtide, but remained asymptomatic.

158 Overall, previous data indicate that hepatitis delta remains a disease difficult to cure,  
159 and even control virologically with the currently proposed drug armamentarium.  
160 Beluvirtide at a greater dosage (5 mg or 10 mg) may enhance virological response,  
161 while knowledge on drug toxicity of this drug remains limited. Otherwise, other  
162 pathways could be taken, including a strategy of drug repurposing that increasingly  
163 proves its relevance in discovery new therapeutic tools (Trivedi et al., 2020). Besides,  
164 it should be noted that although HDV was until recently the only known deltavirus,  
165 others have been described since 2019 in various animals including some mammals  
166 (Chang et al., 2019). This may indirectly contribute gaining a better knowledge of HDV  
167 and drug susceptibility.

168

169

## 170 **Funding**

171 This work was supported by the French Government under the “Investments for the  
172 Future” program managed by the National Agency for Research (ANR),  
173 Méditerranée-Infection 10-IAHU-03.

174

## 175 **Conflicts of interest**

176 The authors have no conflicts of interest to declare. Funding sources had no role in the  
177 design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation  
178 of the data; and preparation, review, or approval of the manuscript.

179

180 **Ethics**

181 All data have been generated as part of the routine work at Assistance Publique-  
182 Hôpitaux de Marseille (Marseille university hospitals), and this study results from  
183 routine standard clinical management. This study has been approved by our  
184 institution's ethics committee (N°2019-001

185

186

187 **Figure legends**

188

189 **Figure 1. Evolution of virological, biochemical and hematological parameters**  
190 **between February 2016 and April 2021**

191 ALT, alanine aminotransferase level; GGT, gammaglutamyl-transferase level; HDV,  
192 hepatitis delta virus; HBV, hepatitis B virus; TDF, tenofovir disproxil fumarate; PEG-  
193 IFN, pegylated-interferon

194

195 **Figure 2. Phylogenetic tree based on the Delta antigen encoding gene.**

196 The fragment of gene encoding for the hepatitis Delta virus (HDV) antigen was 275-  
197 nucleotide long and corresponded to nucleotides 889-1,150 of the HDV genome  
198 GenBank accession no. AM779577.1. HDV sequence obtained by Sanger population  
199 from the case-patient's plasma are indicated by a white bold font and a black  
200 background. Nucleotide alignments were performed using the Muscle software  
201 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Evolutionary history was inferred using  
202 the MEGAX software (<http://www.megasoftware.net/>) using the neighbor-joining  
203 method and the Kimura 2-parameter method. The percentage of replicate trees in  
204 which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is  
205 shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same  
206 units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree; the  
207 scale bars indicate the number of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values >  
208 50% are indicated on the tree.

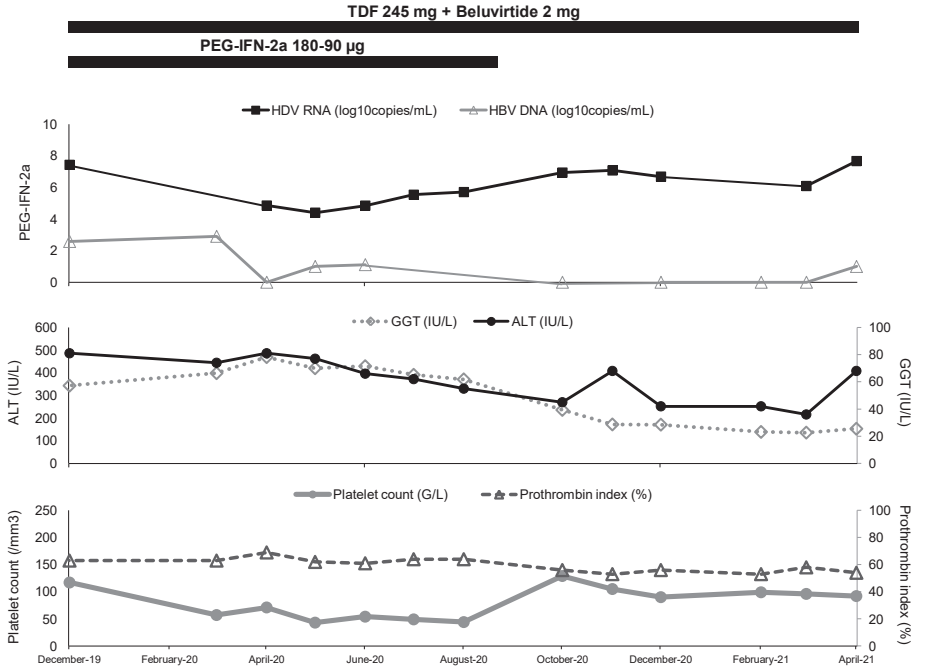
209

210

211 **Figure 1**

212

213

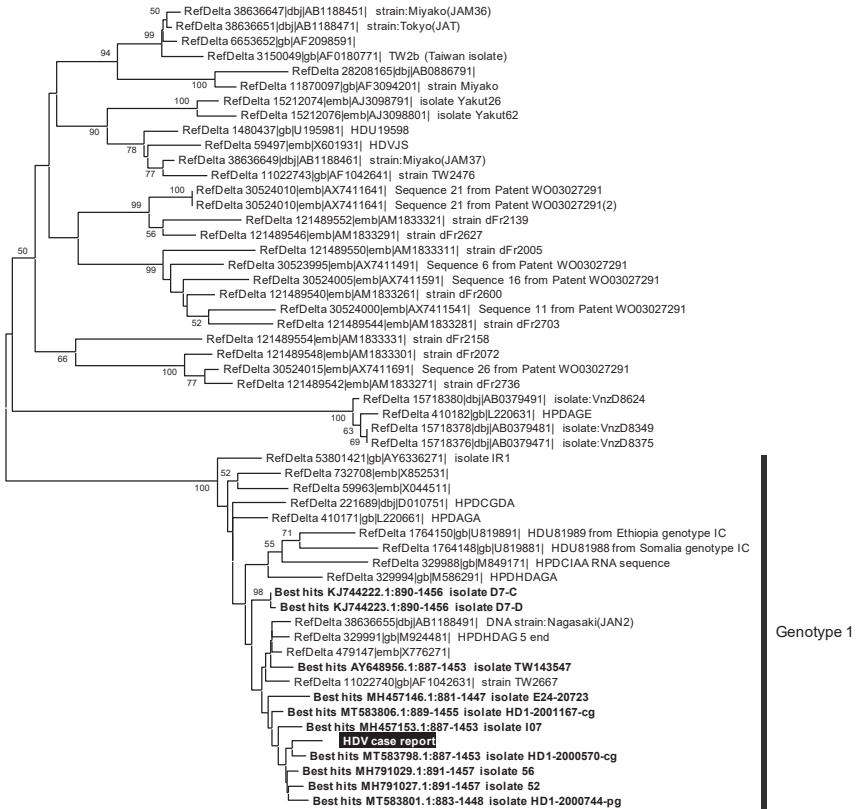


214

215

216 **Figure 2**

217



218

219

220 **References**

221

222 Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova  
223 M, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first  
224 results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol* 2016; 65:490–498.

225 Brancaccio G, Gaeta GB. Treatment of chronic hepatitis due to hepatitis B and hepatitis  
226 delta virus coinfection. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Dec;54(6):697-701. doi:  
227 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.012. Epub 2019 Sep 18.

228 Chang W.-S., J.H.-O. Pettersson, C. Le Lay, Shi M, Lo N, Wille M, et al. 2019. Novel  
229 hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol*. 5: vez021.

230 Cheng D, Han B, Zhang W, Wu W. Clinical effects of NTCP-inhibitor myrcludex B. *J*  
231 *Viral Hepat*. 2021 Feb 17. doi: 10.1111/jvh.13490. Epub ahead of print.

232 Kang C, Syed YY. Bulevirtide: First Approval. *Drugs*. 2020 Oct;80(15):1601-1605. doi:  
233 10.1007/s40265-020-01400-1. PMID: 32926353.

234 Petit PR, Borentain P, Aherfi S, Gérolami R, Colson P. Hepatitis Delta recurrence post-  
235 liver transplantation in absence of detectable hepatitis B surface antigen and hepatitis  
236 B virus DNA in peripheral blood. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2020 Jun;44(3):e41-  
237 e44.

238 Taylor JM. Infection by Hepatitis Delta Virus. *Viruses*. 2020 Jun 16;12(6):648. doi:  
239 10.3390/v12060648. PMID: 32560053; PMCID: PMC7354607.

240 Trivedi J, Mohan M, Byrareddy SN. Drug Repurposing Approaches to Combating  
241 Viral Infections. *J Clin Med*. 2020 Nov 23;9(11):3777.

242 Wedemeyer H, Bogomolov P, Blank A, Allweiss L, Dandri M, Bremer B, et al. Final  
243 results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy  
244 of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-  
245 infection. *J Hepatol* 2018;68: S3.

246 Zhang Z, Urban S. New insights into HDV persistence: The role of interferon response  
247 and implications for upcoming novel therapies. J Hepatol. 2021 Mar;74(3):686-699.

248

249

## TROISIEME PARTIE





# CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Mes travaux de thèse ont tenté d'apporter des éléments concernant la présence chez l'homme ou l'exposition à l'homme de viroïdes, agents décrits uniquement à ce jour chez les plantes, d'entités viroïde-like, correspondant à des petits ARN nus à structure tige-boucle, ou de virus de plantes. Ils sont hétérogènes par leurs approches. Cependant ils ont en commun d'explorer différentes pistes pouvant indiquer la présence chez l'homme ou une exposition de l'homme à des entités biologiques décrites actuellement uniquement dans le monde végétal. Il s'agissait d'une thématique à risque important de résultats négatifs compte-tenu de la quasi-absence de données dans la littérature pour ce qui concerne les projets concernant les viroïdes ou les ARN viroïdes-like chez l'homme, et la diversité des projets a permis d'alterner des travaux complexes avec d'autres moins exploratoires. Et quoiqu'il en soit, ces différents travaux ont tenté par différents chemins d'apporter des réponses aux questions relatives à la perméabilité de la frontière entre les mondes végétaux et animaux, et notamment de répondre à des interrogations de T.O. Diener, le découvreur des viroïdes, qui a souligné que très peu d'efforts ont été faits pour trouver un équivalent des viroïdes chez les humains et les mammifères non humains (T. O. Diener, 2016, p. 201) (Diener, 2020) . Ainsi, cette Thèse a comporté des projets originaux (du fait de la compartimentalisation marquée entre les domaines de la virologie humaine et animale d'une part et de la virologie végétale d'autre part, très peu d'études ont exploré les champs abordés ici) qui ne s'inscrivent pas dans un courant majeur actuel.

Au décours de cette thèse, nous avons décrit pour la première fois des correspondances entre plusieurs séquences de viroïdes et la région « seed » correspondant au très court domaine conservé des extrémités des miRNAs humains. Ces correspondances atteignent fréquemment 100% d'identité. Nous avons par exemple identifié une telle similarité pour le miRNA humain Hsa-MiR-4286, un

médiateur de la prolifération et de l'apoptose des cellules de mélanome associé à des maladies cancéreuses chez l'homme. L'hypothèse d'une interaction entre les viroïdes et divers miRNAs ou ARN messagers humains par le mécanisme d'ARN interférence est ainsi suggérée. Via de telles similarités de séquence, des fragments de viroïdes pourraient s'hybrider à des miRNAs humains avec pour effet d'altérer la fonction de ces miRNAs. Des études ont ainsi suggéré l'existence d'interactions entre des séquences virales et des miRNAs cellulaires (Glazov et al., 2010; Kumar et al., 2009; Rebolledo-Mendez et al., 2013). En effet, les miRNAs cellulaires peuvent réguler à la baisse l'activité des ARNm cellulaires par des interactions avec appariements de bases complémentaires. Dans notre, la correspondance des résultats BLASTn filtrés impliquait une identité à 100% entre la région « seed » de plusieurs séquences de miARN-humain matures et les séquences viroïdes ou, comme contrôle, des séquences générées aléatoirement. Il faut considérer que ces résultats de similarités portent sur une très courte région, au minimum la longueur de la région « seed », et il n'est par conséquent pas étonnant d'obtenir des similarités de 100%, ce qui est ici observé pour les séquences générées de manière aléatoire, et l'a été précédemment également pour plusieurs virus de plantes (Rebolledo-Mendez et al., 2013). Nous avons de même observé des similarités avec les régions « seed » de beaucoup d'autres miRNA que des miRNA humains. Néanmoins, il est intéressant de mettre en évidence que de telles similarités avec des miRNA humains existent *in silico* pour les viroïdes bien que les séquences de ces entités soient elles-mêmes courtes (<450 nucléotides) et que le nombre de génomes de viroïdes soit de 15,924 comprenant de nombreuses séquences très redondantes. Ces données suggèrent qu'une présence de viroïdes chez l'homme par exemple apportés par la consommation de végétaux pourraient conduire à ce que leurs séquences interférentes avec les interactions entre des microRNAs humains et des ARN messagers. De plus, nous avons déterminé que la robustesse de l'hybridation entre les brins d'acides nucléiques pouvait être augmentée par des longueurs de similarité de 100% dépassant la longueur de la région « seed » des microRNAs. Ainsi, même en l'absence de spécificité élevée d'interactions entre des fragments de viroïdes

et la région « seed » de microRNA humains, il nous semble d'intérêt de montrer *in silico* que des tels interactions seraient possibles.

Après ingestion de végétaux contaminés (plantes légumières ou fruitières), la grande stabilité des viroïdes et des petits ARNs qui en sont dérivés pourrait leur permettre de résister chez l'homme, notamment au processus de digestion lors du passage dans le tractus intestinal. Des études complémentaires pourraient être envisagées pour étudier les similarités entre les séquences de viroïdes et les miRNAs décrits chez d'autres vertébrés. Surtout, l'étape suivante serait l'étude de l'interaction des viroïdes avec les cellules humaines *in vitro*, mais elle n'a pu être réalisée au cours de ma dernière année de thèse en 2020. T.O. Diener, le découvreur des viroïdes, a souligné que très peu d'efforts ont été faits pour trouver un équivalent de viroïdes chez les humains et les mammifères non humains (« On the Existence of Animal Viroids ») (T. O. Diener, 2016). Il a cité un travail publié en 1997 par Roy et al. dans lequel des extraits d'ARN de tissus intestinaux d'individus atteints de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique avait été analysé par électrophorèse bidimensionnelle sur gel (Roy et al., 1997). Aucun ARN de type viroïde circulaire n'avait été détecté mais il avait été rapporté la mise en évidence de trois petits ARN linéaires, incluant de l'ARN ribosomal et un fragment homologue de transcrits d'îlots CpG. De manière intéressante, il a été démontré que des viroïdes de la famille *Pospiviroidae* pouvaient se répliquer dans certaines conditions et selon un mode adaptatif dans des plantes hôtes non conventionnelles, telles que *Nicotiana* sp. et *Arabidopsis* sp. (Daròs & Flores, 2004; Feldstein et al., 1998). De plus, il a été montré que des viroïdes pouvaient être propagés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la cyanobactérie *Nostoc* (Delan-Forino et al., 2011; Latifi & Bernard, 2016). L'ARN du *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), un membre des *Pospiviroidae* de la pomme de terre, est par exemple capable de produire des génomes de viroïdes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Friday, 2017). Par ailleurs, Daros et al. (2018) ont récemment co-exprimé chez *Escherichia coli* l'*Eggplant latent viroid* (ELVd), un membre des *Avsunviroidae*

présent chez les aubergines, avec une ARNt ligase chloroplastique. Ils ont démontré que des précurseurs de l'ELVD étaient auto-clivés par des ribozymes en tête de marteau générant des quantités importantes de formes précurseurs de viroïdes (monomères) s'accumulant dans les bactéries. Ces données expérimentales d'interactions entre des viroïdes et des organismes éloignés du règne des plantes suggèrent que le spectre d'hôte des viroïdes pourrait être plus large qu'actuellement admis. Les approches utilisées dans ces travaux pourraient être adaptées à d'autres cellules eucaryotes, et en particulier à des cellules d'animaux vertébrés dont des cellules humaines. Ceci permettrait d'une part d'évaluer la réplication éventuelle des viroïdes et leur effet dans les cellules testées, et d'autre part d'étudier le processus de détournement de la machinerie moléculaire des lignées cellulaires humaines par les viroïdes.

La présence de viroïdes ou d'entités viroïde-like chez l'homme n'a pas été montrée au cours de mes travaux. Ce type particulier d'acide nucléique et d'agent infectieux pourrait possiblement en cas de présence chez l'homme interagir avec les acides nucléiques humains, notamment les ARN messagers, étant donné qu'il semble que leur mécanisme de pathogénicité chez les plantes soit lié à un phénomène d'interférence, et que des petits fragments d'ARN semblables à des miRNAs soient produits au cours d'infections (Hamann & Steger, 2012; Navarro et al., 2012). Très peu d'efforts ont été faits pour trouver un équivalent de viroïdes chez les humains et les mammifères non humains. En fait, depuis la découverte des viroïdes il y a environ 50 ans (T. O. Diener, 1971), quasiment aucune étude n'a recherché l'équivalent des viroïdes chez les animaux dont l'homme (T. Diener, 2016). La nature des viroïdes, de courts ARN nus, rend cette quête difficile. Comme T.O. Diener, nous nous sommes demandé si les viroïdes, les entités viroïdes ou leurs dérivés d'ARN courts pouvaient interagir avec les cellules humaines. En fait, il serait surprenant que des entités telles que les viroïdes soient restreints au règne végétal. Nous avons réalisé du séquençage de nouvelle génération d'extraits ARN d'échantillons végétaux et humains après sélection des ARN de très petite taille. Nous n'avons pas mis en évidence de séquences

similaires à celles de viroïdes connus, tandis que celles de séquences viroïde-like parmi les séquences « ORFan » est par définition limitée par l'absence de séquences de marteau. Nous avons effectué un séquençage d'ARN spécifique à l'aide de la technologie de séquençage de deuxième génération Illumina pour l'identification de petits ARN à partir d'échantillons de plasma humain et de feuilles de plantes. Le but de cette expérience était de détecter et de générer de courtes séquences pour détecter des fragments de viroïdes, de microARN ou d'ARN courts connus dans des échantillons de plasma humain et des échantillons dérivés de plantes. Malheureusement, tous les échantillons d'ADNc amplifiés indexés préparés à partir d'échantillons végétaux et cliniques sélectionnés n'ont pas passé les étapes de contrôle de qualité. De plus, aucune des séquences générées ne correspondait à des séquences viroïdes connues, y compris le viroïde présent dans l'un des échantillons. De plus, l'analyse des similitudes avec les séquences de la base de données GenBank n'a pas identifié de cohérence entre les résultats et la nature des échantillons biologiques testés. Pour résumer, notre présente étude n'a pas confirmé la détection de viroïdes à partir d'échantillons de contrôle de plantes viroïdes et n'a pas révélé la présence d'ARN court d'intérêt potentiel, ou que nous avons pu reconnaître comme d'intérêt potentiel, dans des échantillons de plasma humain. Par conséquent, une réévaluation complète du protocole de séquençage à haut débit et son optimisation pour les échantillons cliniques et végétaux seront nécessaires. Il serait notamment important de sélectionner rigoureusement les contrôles les plus appropriés. Ils doivent contenir une plus grande quantité d'acide nucléique connue d'ARN de taille attendue. Avec une expérience plus récente acquise sur le terrain NGS, nous pensons que passer plus de temps à optimiser le protocole peut permettre de mener de meilleures expériences NGS. Les efforts pour détecter les viroïdes ou les entités de type viroïde chez l'homme ou d'autres animaux devraient être intensifiés dans les études futures. La technologie CRISPR-Cas a déjà été utilisée pour la détection rapide de viroïdes dans le domaine du diagnostic végétal en les combinant à des protocoles de séquençage à haut débit



(Jiao et al., n.d.)(Hadidi, 2019). Ces protocoles pourraient être appliqués à la recherche de viroïdes chez l'humain.

Un autre aspect de mon travail a porté sur l'analyse phylogénétique de séquences codant pour l'antigène de l'agent Delta, qui cause une hépatite chez l'homme et dont j'ai participé à la description de deux cas d'infection par des agents Delta de génotype 1, le génotype majoritaire (Colson et al., 2021). L'agent Delta possède certaines caractéristiques des viroïdes avec une région ribozyme, et pourrait être le résultat d'une fusion ou recombinaison avec une séquence codante (Gilbert, 1986). Très récemment d'autres séquences similaires à celles de l'agent Delta, notamment à sa partie ribozyme, ont été détectées chez des canards, serpents et des rongeurs (Paraskevopoulou et al., 2020).

Dans un autre travail moins exploratoire, j'ai recherché la présence de tobamovirus, d'autres pathogènes de plantes, dans des tomates et produits dérivés alimentaires, dans la continuité de travaux précédemment réalisés dans le laboratoire. Des travaux précurseurs réalisés dans le laboratoire avaient montré la présence chez l'homme de virus du piment dans les selles, et de virus de la mosaïque du tabac dans les selles et dans la salive (Colson et al., 2010; Daròs et al., 2018; Jiao et al., n.d.). Par ailleurs, ces tobamovirus avaient été retrouvés respectivement dans les sauces à base de piment et dans les cigarettes, indiquant que les humains y sont directement exposés (Balique et al., 2012; Colson et al., 2010). De plus, des anticorps anti-TMV ont été décrits chez des fumeurs aux Etats-Unis (Liu et al., 2013) et l'analyse par séquençage de nouvelle génération d'échantillons d'oropharynx et de matières fécales chez trois enfants sains de moins de 1 an dans une communauté semi-rurale au Mexique a retrouvé au moins un virus de plante dans 100% des échantillons de matières fécales et dans 65 % des échantillons d'oropharynx (Aguado-García et al., 2020); les tobamovirus étaient les virus de plantes les plus fréquemment détectés. L'auteur également a été montré que le *Cowpea mosaic virus*, un autre virus de plante

appartenant au genre *Comovirus*, pouvait se lier et pénétrer dans des cellules de mammifères y compris les cellules endothéliales, particulièrement l'endothélium néovasculaire tumoral, et que cette liaison aux cellules endothéliales faisait intervenir une protéine de surface cellulaire, la vimentine (Koudelka et al., 2009).

Les tomates utilisées pour la production de sauces, coulis et condiments comme le ketchup, sont cultivées presque exclusivement en plein champs. La plupart de ces variétés de tomates sont dépourvues de gènes de résistance aux tobamovirus et sont donc susceptibles d'être infectées par ces virus présents dans l'environnement. Leur infection et les symptômes qu'elles développent ne limitent pas forcément leur utilisation dans le processus de transformation agroalimentaire conduisant à la production d'aliments à base de tomate. Ce n'est pas le cas des plants de tomate dont les fruits de consommation sont directement commercialisés et qui doivent, pour leur commercialisation, être dénués de signes visibles d'infection. Les variétés produisant des fruits de consommation, qui en Europe sont principalement cultivées sous abri (serre et tunnels) possèdent très majoritairement quant à elles des gènes de résistance aux tobamovirus. Ici, nous avons pu détecter la présence du ToMV et du PMMoV dans des produits dérivés des tomates mais pas dans des fruits de tomates destinés à leur consommation directe. L'idée principale derrière cette étude était de trouver la présence de tobamovirus dans les produits alimentaires dérivés de la tomate. Ceci est conforme au fait que les tomates infectées par le tobamovirus peuvent être utilisées pour fabriquer des produits dérivés de la tomate. La détection des tobamovirus dans les sauces tomates n'a pas été confirmée par inoculation sur des échantillons de plantes sensibles. Une limite de la présente étude est le faible nombre d'échantillons analysés. L'interaction des tobamovirus, très résistants avec les mammifères dont l'homme, mérite ainsi d'être explorée. Les tobamovirus qui provoquent des symptômes liés à la mosaïque ont un large éventail de plantes hôtes, notamment des solanacées (poivre, tabac, tomate), des cucurbitacées (melon, concombre) et plus de 150 autres hôtes dans le monde. Récemment, les productions de cultures de solanacées ont été sérieusement affectées par deux membres du genre Tobamovirus, le très stable Tomato mottle

mosaic virus (ToMMV) et surtout Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) (Smith et al., 2018; Webster et al., 2014). Par ailleurs, il serait intéressant de collecter différentes variétés de tomates porteuses et non porteuses de gènes de résistance comme les tomates anciennes pour détecter, par exemple, la présence du virus tomate brown rugose fruit (ToBRFV), un nouveau virus émergent qui infecte tous les cultivars de tomates. De manière intéressante, suite aux résultats d'études suggérant que le tabagisme pourrait protéger contre l'infection par le SARS-CoV-2 sur la base que la prévalence du tabagisme chez les patients hospitalisés pour COVID-19 était plus faible que dans la population générale, il a été proposé que, aux côtés de la nicotine et d'autres produits chimiques contenus dans la fumée de tabac, le virus de la mosaïque du tabac puisse être impliqué dans cet effet (de Bernardis & Busà, 2020).

Pour conclure, la présence d'entités viroïde-like, de viroïdes et de virus de plantes chez l'homme, et leurs effets, bénéfiques ou délétères, restent un champ très insuffisamment exploré. L'analyse massive de séquences produites de manière exponentielle à haut débit est une voie possible d'investigation, mais il faut aussi se tourner vers la mise en place d'expérimentation ou tests biologiques afin d'avancer dans ce domaine. Une piste particulièrement d'intérêt est celle des ribozymes en tête de marteau. Ce sont des endonucléases ARN qui confèrent des propriétés d'auto-clivage. Ils ont été décrits dans les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* et dans les ARN satellites de virus végétaux. Cependant, ils sont très communs dans la biosphère, et composent notamment des parties actives du ribosome. Ils ont ainsi été détectés dans de nombreux mammifères, dont l'homme, ainsi que dans des bactéries et des archées.

## References

- Aguado-García, Y., Taboada, B., Morán, P., Rivera-Gutiérrez, X., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximénez, C., & Arias, C. F. (2020). Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx and gut of infants during their first year of life. *Scientific Reports*, *10*(1), 13595. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>
- Balique, F., Colson, P., & Raoult, D. (2012). Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers. *Journal of Clinical Virology*, *55*(4), 374–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.012>
- Colson, P., Boschi, C., Bengone-Abogourin, J. G., Brechard, L., Motte, A., & Allemand, I. (2021). Concurrent Nanopore Next-Generation Sequencing of Hepatitis B and Delta Virus Genomes Directly From Patient Plasma. *Annals of Laboratory Medicine*, *41*(6), 608–611. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.6.608>
- Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.-J., Berbis, P., Lecoq, H., Harlé, J.-R., Berland, Y., & Raoult, D. (2010). Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. *PLOS ONE*, *5*(4), e10041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010041>
- Daròs, J.-A., Aragonés, V., & Cordero, T. (2018). A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in Escherichia coli. *Scientific Reports*, *8*(1), 1904. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- Daròs, J.-A., & Flores, R. (2004). Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(17), 6792–6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401090101>

- de Bernardis, E., & Busà, L. (2020). A putative role for the tobacco mosaic virus in smokers' resistance to COVID-19. *Medical Hypotheses*, 143, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110153>
- Delan-Forino, C., Maurel, M.-C., & Torchet, C. (2011). Replication of Avocado Sunblotch Viroid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology*, 85(7), 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-10>
- Diener, T. (2016). Viroids: “Living fossils” of primordial RNAs? *Biology Direct*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0116-7>
- Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45(2), 411–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)
- Diener, T. O. (2016). On the Existence of Animal Viroids. *Virology & Antiviral Research*, 2016. <https://doi.org/10.4172/2324-8955.1000163>
- Feldstein, P. A., Hu, Y., & Owens, R. A. (1998). Precisely full length, circularizable, complementary RNA: An infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6560–6565. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6560>
- Friday, D. R. (2017). *Processing of Potato Spindle Tuber Viroids (PSTVd) RNAs in Yeast, a Nonconventional Host* [Ph.D., University of the Sciences in Philadelphia]. <https://search-proquest-com.lama.univ-amu.fr/docview/1992750260/abstract/2CC59947EA254A16PQ/1>
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319, 618.
- Glazov, E. A., Horwood, P. F., Assavalapsakul, W., Kongsuwan, K., Mitchell, R. W., Mitter, N., & Mahony, T. J. (2010). Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome. *Journal of General Virology*, 91(1), 32–41. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014290-0>
- Hadidi, A. (2019). Next-Generation Sequencing and CRISPR/Cas13 Editing in Viroid Research and Molecular Diagnostics. *Viruses*, 11(2), 120. <https://doi.org/10.3390/v11020120>

- Hammann, C., & Steger, G. (2012). Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biology*, 9(6), 809–819.
- Jiao, J., Kong, K., Han, J., Song, S., Bai, T., Song, C., Wang, M., Yan, Z., Zhang, H., Zhang, R., Feng, J., & Zheng, X. (n.d.). Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnology Journal*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/pbi.13474>
- Koudelka, K. J., Destito, G., Plummer, E. M., Trauger, S. A., Siuzdak, G., & Manchester, M. (2009). Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000417. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000417>
- Kumar, S., Ansari, F. A., & Scaria, V. (2009). Prediction of viral microRNA precursors based on human microRNA precursor sequence and structural features. *Virology Journal*, 6(1), 129. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-129>
- Latifi, A., & Bernard, C. (2016). Replication of Avocado Sunblotch Viroid in the Cyanobacterium *Nostoc* Sp. PCC 7120. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 07(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000341>
- Liu, R., Vaishnav, R. A., Roberts, A. M., & Friedland, R. P. (2013). Humans Have Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. *PLOS ONE*, 8(4), e60621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060621>
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.-E., Delgado, S., Flores, R., & Di Serio, F. (2012). Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie*, 94(7), 1474–1480.
- Paraskevopoulou, S., Pirzer, F., Goldmann, N., Schmid, J., Corman, V. M., Gottula, L. T., Schroeder, S., Rasche, A., Muth, D., Drexler, J. F., Heni, A. C., Eibner, G. J., Page, R. A., Jones, T. C., Müller, M. A., Sommer, S., Glebe, D., & Drosten, C. (2020). Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>

- Rebolledo-Mendez, J., Vaishnav, R., Cooper, N., & Friedland, R. (2013). Cross-kingdom sequence similarities between human micro-RNAs and plant viruses. *Communicative & Integrative Biology*, 6(5), e24951. <https://doi.org/10.4161/cib.24951>
- Roy, G., Mercure, S., Beuvon, F., & Perreault, J.-P. (1997). Characterization of stable RNAs from the resected intestinal tissues of individuals with either Crohn's disease or ulcerative colitis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 75(6), 789–794.
- Smith, R. L., Lawrence, J., Shukla, M., Singh, M., Li, X., Xu, H., Gardner, K., & Nie, X. (2018). First Report of *Coleus blumei* viroid 5 and Molecular Confirmation of *Coleus blumei* viroid 1 in Commercial *Coleus blumei* in Canada. *Plant Disease*, 102(9), 1862–1862. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0055-PDN>
- Webster, C. G., Rosskopf, E. N., Lucas, L., Mellinger, H. C., & Adkins, S. (2014). First Report of Tomato mottle mosaic virus Infecting Tomato in the United States. *Plant Health Progress*, 15(4), 151–152. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0023>





# Résumé

Du fait de la compartimentation marquée entre les domaines de la virologie humaine et animale d'une part et de la virologie végétale d'autre part, très peu d'études ont exploré ce champ. Ces travaux ont tenté d'apporter des éléments concernant la présence chez l'homme d'entités viroïde-like et des virus de plantes notamment les tobamovirus. Les viroïdes sont des entités uniques constituées d'un ARN nu, palindromique non codant court. Les viroïdes ou les éléments de type viroïde n'ont pas été décrits dans d'autres organismes que les plantes, ce qui suggère qu'ils ont été négligés. Ce type particulier d'acide nucléique infectieux pourrait possiblement en cas de présence chez l'homme interagir avec les acides nucléiques humains, notamment les ARN messagers, étant donné qu'il semble que leur mécanisme de pathogénicité chez les plantes soit lié à un phénomène d'interférence. D'un autre côté, le virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) et le virus de la marbrure douce du poivron (PPMoV) sont des virus végétaux à ARN nu, en forme de bâtonnet qui ont été décrits chez les plantes, dans les produits alimentaires à base de piments et chez l'homme. L'interaction des tobamovirus, qui sont très résistants, avec les mammifères dont l'homme reste là encore un champ à explorer. Chez l'homme, l'agent delta, qui cause l'hépatite, contient un fragment de type viroïde dont on soupçonnerait d'être dérivé des viroïdes. Nous visons à détecter les éléments de type viroïde et des tobamovirus dans les échantillons cliniques et dans les sauces tomates. Des approches *in silico* et moléculaires comme le séquençage de nouvelle génération sont utilisées afin d'étudier leurs interactions chez l'humain.

## Abstract

Due to the significant compartmentalisation between the fields of human and animal virology on the one hand and plant virology on the other, very few studies have explored this field. This work has attempted to provide evidence for the presence in humans of viroid-like entities and plant viruses, notably tobamoviruses. Viroids are unique entities consisting of a short, naked, palindromic, non-coding RNA. Viroids or viroid-like entities have not been described in organisms other than plants, suggesting that they have been overlooked. This infectious nucleic acid could possibly, if present in humans, interact with human nucleic acids, especially messenger RNAs, as their mechanism of pathogenicity in plants seems to be related to an interference phenomenon. On the other hand, Tomato Mosaic Virus (ToMV) and Pepper Mild Mottle Virus (PPMoV) are non-enveloped, rod-shaped RNA plant viruses that have been described in plants, chilli-based food products and humans (saliva of smokers and faeces of some patients). The interaction of tobamoviruses, which are highly resistant, with mammals, including humans, is still a field of study to be explored. In humans, the delta agent, which causes hepatitis, contains a viroid-like fragment suspected to be derived from viroids. Our aim is to detect viroids, viroid-like elements and tobamoviruses in clinical samples and in commercial tomato-based sauces. *In silico* approaches as well as molecular approaches including next generation sequencing are used to study their interactions in humans.