



HAL
open science

La maladie du dépérissement de l'ananas à La Réunion : enquête épidémiologique et évaluation du diagnostic métagénomique viral

Delphine Massé

► To cite this version:

Delphine Massé. La maladie du dépérissement de l'ananas à La Réunion : enquête épidémiologique et évaluation du diagnostic métagénomique viral. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0035 . tel-04526564

HAL Id: tel-04526564

<https://theses.hal.science/tel-04526564v1>

Submitted on 29 Mar 2024

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.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION
Faculté des Sciences et Technologies

UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de La Réunion

École doctorale Sciences Technologies Santé (STS, ED 542)

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA REUNION

Discipline du doctorat : Biologie Moléculaire

**La maladie du dépérissement de l'ananas à La Réunion :
enquête épidémiologique et
évaluation du diagnostic métagénomique viral**

Présentée et soutenue publiquement par

Delphine MASSÉ

Le 16 novembre 2023, devant le jury composé de :

Stéphane POUSSIER
Cécile DESBIEZ
Emmanuel JACQUOT
Sébastien MASSART
Nathalie BECKER

Professeur, Université de La Réunion
Chargée de recherche HDR, INRAe, Avignon
Directeur de Recherche, INRAe, Montpellier
Professeur, Université de Liège, Gembloux
Maître de conférence HDR, MNHN, Paris

Président
Rapporteure
Rapporteur
Examineur
Examinatrice

Jean-Michel LETT
Pierre LEFEUVRE
Aude CHABIRAND

Chercheur HDR, CIRAD, La Réunion
Chercheur, CIRAD, La Réunion
Cheffe d'Unité, Anses, La Réunion

Directeur de thèse
Co-encadrant
Invitée



Remerciements

Une thèse sur les virus de l'ananas ? Mais évidemment elle est faite pour moi, oui bien sûr je veux me lancer dans l'aventure, enfin si vous voulez bien de moi ! Et me voilà à réaliser un projet resté inachevé 20 ans avant. Ce fut une belle expérience extrêmement enrichissante où j'ai énormément appris sur tant de domaines, et tout ça grâce à une équipe et un entourage exceptionnel.

Tout d'abord je tiens à remercier Nathalie Becker, Cécile Desbiez, Emmanuel Jacquot, Sébastien Massart et Stéphane Poussier pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, ainsi que le temps consacré à l'évaluation de mon travail. Merci aux membres de mon comité de thèse Thierry Candresse, Frédéric Chiroleu, Denis Filloux, Sébastien Massart, Philippe Roumagnac, Pierre-Yves Teycheney et Eric Verdin pour m'avoir aiguillée tout au long de ce projet.

Une immense merci à mon directeur de thèse Jean-Michel Lett, qui a accepté de diriger cette thèse avec une candidate atypique qui malgré son grand âge a voulu jouer à l'étudiante pendant ces quatre années. Merci de m'avoir encadrée et accompagnée pendant tout ce temps dans ce projet un peu fou.

Un très grand merci à Pierre Lefeuvre, de m'avoir appris tout le volet bio-informatique même si je n'ai pas fait le grand saut sous Linux, un jour peut-être...Merci d'avoir entrepris de développer mon esprit critique, la précision et la rigueur (et je venais de loin !). Merci d'avoir commencé à affûter mon œil enfin qu'il devienne aussi averti que toi pour détecter les moindres défauts d'alignement de quelques millimètres ou les tailles des polices (attention Pierre retire ses lunettes, le scan est lancé, rien ne lui échappera !).

Merci à Frédéric Chiroleu avec qui j'ai passé de nombreuses heures à travailler sous R pour essayer de tourner dans tous les sens ces données qui ne voulaient pas se laisser faire. Merci de m'avoir expliquée les statistiques, cette bête étrange qui fait peur et que je n'arrive pas encore à bien dompter, mais j'y travaille !

Et pour finir avec le petit dernier arrivé plus tardivement dans cette équipe de choc (et de chauve), merci à Pierre-Yves Teycheney, le roi de la taxonomie et des relectures méticuleuses, pour son soutien, ses encouragements et sa bienveillance.

Passer de collègues de travail à un rapport hiérarchique encadrants/étudiante n'a pas toujours été facile mais je ne regrette pas quand je constate le bon immense de mes compétences grâce à vous que j'espère pouvoir exploiter au mieux. Un énorme merci à tous pour vos nombreuses relectures, la rédaction n'a pas été facile loin de là !

Un grand merci à Bruno Hostachy, qui restera quelque part toujours mon chef, d'avoir fini par réussir à me voler à l'INRA après de multiples tentatives, il y a presque 15 ans maintenant, pour me recruter au LNPV de la Réunion. Merci de m'avoir accompagnée dans ce projet un peu audacieux. Tes mises en garde sur la dureté de la tâche ont raisonné particulièrement lors des moments difficiles et de doutes, je t'avais dit que oui je réalisais la difficulté mais effectivement on ne réalise vraiment que lorsqu'on y est confronté.

Merci à Aude Chabirand, qui a pris sa continuité et a continué à me préserver du côté Anses pour que je passe un maximum de temps sur ma thèse. Merci à Philippe

Regnault qui a accepté que cette thèse se passe en grande majorité sur mon temps de travail. Je remercie mon équipe LSV-RAPT de m'avoir mis 'hors circuit' pour tous ce qui concerne la qualité, pourtant vous savez comment j'aime ça et vous pouvez imaginer combien cela m'a manquée.... J'espère que cette période 'out' ne sera pas définitive et que vous saurez à nouveau me réintégrer dans l'équipe, même si la nature a horreur du vide. Un grand merci plus particulier à Nathalie et Aurélie qui ont su m'écouter et me soutenir lors des coups de mous, avec l'aide précieuse de Nathalie au laboratoire, secondée sur la fin par Lucile, et de Gilles pour ses connaissances en informatique.

Merci également à toutes les collaborations que j'ai sollicitées avant et pendant cette thèse que cela soit sur la partie HTS avec Armelle Marais-Colombel et Emmanuel Fernandez, au labo avec Murielle Hoareau, ou encore sur le terrain avec Alain Soler. Merci à Nathalie Becker et Frédéric Labbé pour leurs encouragements et les discussions tardives, aux heures où le Cirad s'endort.

Merci à mes compagnons de galère les deux autres thésards de virologie, Daniel et Sélim, qui m'ont donné quelques tuyaux sous R ou encore pour les discussions sur nos sujets respectifs. Un clin d'œil particulier à Sélim, avec qui j'ai pu échanger tout au long de ces longues journées, sur nos malheurs respectifs. J'espère t'avoir soutenue autant que tu l'as fait pour moi, surtout sur cette dernière ligne droite qu'est la rédaction, afin qu'on évacue mutuellement cette pression. Echanger avec quelqu'un qui vit les mêmes choses quasiment au même moment (et avec les mêmes encadrants !), a vraiment été salutaire pour moi.

Merci aussi à mes amis qui m'ont soutenue chacun à leur manière, par leur soutien, leur écoute et leur encouragement : Carole et Fabrice, Jean et Colette, Elodie, Marianne, Clo, Mouloud, Karine, Géraldine, JB, Nathalie, Marie...

Merci à tous ce qui ont croisés mon chemin pendant ces années, que cela soit dans le cadre du travail, des congrès, ou dans la vie tout simplement, qui ont parfois qualifié ce projet de courageux, voulaient-ils dire inconscient ?

Merci à mon hôtel particulier trois étoiles, sponsorisé par CARIC qui m'a accueillie ces cinq derniers mois les soirs de semaines ou certains weekends, afin de m'immerger dans cette rédaction. Cette vie d'Hermitte m'a permis de ressentir à nouveau les sensations de la vie étudiante, seule, sans contrainte familiale, entre grignotage et bachotage, avec Netflix en plus, mais la fête en moins ! J'avoue que cette tranquillité et légèreté va peut-être un peu me manquer !

Un grand merci au propriétaire de cet hôtel, Sébastien avec qui je partage ma vie, d'avoir finit pas comprendre que je n'abandonnais pas le foyer familial, mais qu'il est vrai que je l'ai remis au second plan pour privilégier une expérience personnelle, afin de me réaliser professionnellement. Je sais que cela n'a pas été évident pour toi (ni pour moi, si si !!!), et que tu avais passé l'âge d'être avec une étudiante, mais tu as tenu bon et je t'en remercie. Tu as assuré comme un chef pendant toutes ces semaines de gestion du quotidien en super Papa, mais aussi à la fois dans ton travail et en tant que responsable des travaux, car toi aussi tu avais tes projets en parallèle ! La prochaine fois que tu as envie de faire un trip kite ou moto cela va être difficile de te dire non !

Merci à mes filles Léane et Manon de s'être inquiétées pour moi et pour mon travail. Je vous ai délaissées au profit de ce projet un peu égoïste et carriériste, mais ça y s'est finis, je vais avoir du temps maintenant à vous consacrer en tant que Maman.

Vous n'aurez plus à demander si je travaille ce soir, si je rentre dormir à la maison, si je peux vous laisser mon écharpe pour dormir, ou encore ne plus dire à la maîtresse que maman n'a pas signée car elle fait une thèse sur les virus de l'ananas et qu'elle n'est pas là... Me voir travailler comme ça vous aura peut-être donné goût aux études, ou au contraire vous aura dégouté, l'avenir nous le dira !

Enfin, merci à ma mère, mon frère et sa famille, qui m'ont encore moins vu qu'avant. Comme tu me l'as dit Maman j'étais déjà bien occupée et me lancer dans cette aventure difficile, a un peu plus compliqué la tâche c'est certain, mais maintenant je vais pouvoir souffler. Merci à mon père qui aurait été fier de moi j'en suis certaine, mais qui quelque part m'a certainement accompagnée tout au long de mon parcours avec son amour pour les plantes et la nature. Papa je te dédis cette thèse.

Revenir étudiante n'a pas été chose facile mais j'ai survécu et je suis heureuse d'avoir parcouru ce long chemin souvent difficile qui a nécessité pas mal de sacrifice personnel mais c'était le contrat.

Quatre ans c'est à la fois long et en même temps court, j'aurais aimé obtenir plus de résultats, en faire plus, mais le temps et mes neurones m'ont fait défaut parfois. L'aventure s'achève (enfin... !). Je vais pouvoir reprendre une activité normale. Mais que vais-je faire de tous ce temps ? Fini de quitter le travail un peu avant 20h, fini les nuits et we devant le PC, les insomnies en pleine nuit, les réveils avec les phrases qui danses dans la tête, fini de grignoter à n'importe quelle heure (et fini les kilos en plus !), fini la vie d'étudiante chez CARIC, fini la vie entre parenthèse, je vais m'ennuyer non ?!

Vive le retour tant attendu au foyer, pour s'occuper des enfants, du conjoint, de la maison, des courses, des repas, du linge, des devoirs, La liberté quoi ! ... heu finalement quelqu'un a parlé d'un post-doc ?!!!

J'ai essayé d'être plus synthétique que les autres parties de ma thèse mais je confirme que ce n'est vraiment pas mon fort ! Au moins personne aura à relire...

Sommaire

Liste des acronymes viraux selon le comité international de taxonomie virale	I
Liste des abréviations	II
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	IX
Table des matières.....	XII

Liste des acronymes viraux selon le comité international de taxonomie virale

Acronyme Virus

AcSV	Ananas comosus secovirus
BanMMV	banana mild mosaic virus
BGMaV	blueberry green mosaic associated virus
BSGFV	banana streak GF virus
BSMyV	banana streak Mysore virus
BSOLV	banana streak OL virus
BVBaV	blackberry vein banding-associated virus
BYSV	beet yellow stunt virus
BYV	beet yellows virus
CaYMV	Canna yellow mottle virus
CIYMV	Citrus yellow mosaic virus
CMV	cucumber mosaic virus
CoYMV	Commelina yellow mottle virus
CV1	cordyline virus 1
CSSV	Cacao swollen shoot virus
CTV	Citrus tristeza virus
GLRaV	grapevine leafroll-associated virus
GVG	grapevine virus G
KTSV	Kalanchoë top-spotting virus
LChV2	little cherry virus 2
LIYV	lettuce infectious yellows virus
MV2	mint virus 2
PapMV	papaya mosaic virus
PBCOV	pineapple bacilliform CO virus
PBERV	pineapple bacilliform er virus
PBNSPaV	plum bark necrosis stem pitting-associated virus
PinVA	pineapple virus A
PMWaV1 à 3	pineapple mealybug wilt-associated virus 1 à 3
PMWaV5 à 7	pineapple mealybug wilt-associated virus 5 à 7
PRSV	papaya ringspot virus
PSVA	pineapple secovirus A
PSVB	pineapple secovirus B
PSVC à D	pineapple secovirus C à D
PYMoV	piper yellow mottle virus
RTBV	rice tungro bacilliform virus
RTSV	rice tungro spherical virus
RYMV	rice yellow mottle virus
SCBIMV	sugarcane bacilliform IM virus
SCBMV	sugarcane bacilliform Mor virus
SCMMV	sugarcane mild mosaic virus
SPCSV	sweet potato chlorotic stunt virus
SPFMV	sweet potato feathery mottle virus
SRV	Schefflera ringspot virus
TaBV	taro bacilliform virus
TBSV	tomato bushy stunt virus
TMV	tobacco mosaic virus
ToCV	tomato chlorosis virus
TSWV	tomato spotted wilt virus
TuMV	turnip mosaic virus
TYLCV	tomato yellow leaf curl virus

Espèce virale

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature binomiale
<i>Ananas comosus secovirus</i>	<i>Sadwavirus gammanananas</i>
<i>Banana mild mosaic virus</i>	<i>Banmivirus BanMMV</i>
<i>Blueberry green mosaic associated virus</i>	<i>Vitivirus BGMaV</i>
<i>Banana streak GF virus</i>	<i>Badnavirus alphavirgamusae</i>
<i>Banana streak Mysore virus</i>	<i>Badnavirus gammavirgamusae</i>
<i>Banana streak OL virus</i>	<i>Badnavirus deltavirgamusae</i>
<i>Blackberry vein banding-associated virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Beet yellow stunt virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Beet yellows virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Canna yellow mottle virus</i>	<i>Badnavirus betamaculaflavicanneae</i>
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	<i>Badnavirus tesselloctri</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Commelina yellow mottle virus</i>	<i>Badnavirus maculacommelinae</i>
<i>Cordyline virus 1</i>	En cours d'actualisation
<i>Cacao swollen shoot virus</i>	<i>Badnavirus alphasinflatheobromae</i>
<i>Citrus tristeza virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Grapevine leafroll-associated virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Grapevine virus G</i>	En cours d'actualisation
<i>Kalanchoë top-spotting virus</i>	<i>Badnavirus maculakalanchoes</i>
<i>Little cherry virus 2</i>	En cours d'actualisation
<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Mint virus 2</i>	En cours d'actualisation
<i>Papaya mosaic virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Pineapple bacilliform CO virus</i>	<i>Badnavirus alphanananas</i>
<i>Pineapple bacilliform er virus</i>	<i>Badnavirus betananas</i>
<i>Plum bark necrosis stem pitting-associated virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 à 3</i>	Pas encore reconnue par l'ICTV
<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 5 à 7</i>	En cours d'actualisation par l'ICTV
<i>Papaya ringspot virus</i>	Pas encore reconnue
<i>Pineapple secovirus A</i>	En cours d'actualisation
<i>Pineapple secovirus B</i>	<i>Sadwavirus alphanananas</i>
<i>Pineapple secovirus C</i>	<i>Sadwavirus betananas</i>
<i>Pineapple secovirus D</i>	Pas encore reconnue par l'ICTV
<i>Piper yellow mottle virus</i>	<i>Badnavirus maculapiperis</i>
<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	<i>Tungrovirus oryzae</i>
<i>Rice tungro spherical virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Rice yellow mottle virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Sugarcane bacilliform IM virus</i>	<i>Badnavirus gammasacchari</i>
<i>Sugarcane bacilliform Mor virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Sugarcane mild mosaic virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Schefflera ringspot virus</i>	Pas encore reconnue par l'ICTV
<i>Taro bacilliform virus</i>	<i>Badnavirus alphacolocalsiae</i>
<i>Tomato bushy stunt virus</i>	<i>Tombusvirus lycopersici</i>
<i>Tobacco mosaic virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Tomato chlorosis virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Orthotospovirus tomatomaculae</i>
<i>Turnip mosaic virus</i>	En cours d'actualisation
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	En cours d'actualisation

Liste des abréviations

• Organismes et institutions

3P :	Pôle de Protection des Plantes
Anses :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARMEFLHOR :	Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole
AROP-FL :	Association Réunionnaise des Organisations de Producteurs de Fruits et Légumes
Cirad :	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
DGAL :	Direction Générale de l'Alimentation
DAAF :	Direction de l'agriculture et de la forêt
FDGDON :	Fédération Départementale des Groupement de Défense contre les Organismes Nuisibles
GenBank :	Banque de données génomiques des Etats-Unis d'Amérique
ICTV :	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INRAe :	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
LSV :	Laboratoire de la Santé des Végétaux
NCBI :	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
MNHN :	Muséum National d'Histoire Naturelle
PRI :	<i>Pineapple Research Institute</i>
SRA :	<i>Sequence Read Archive</i>
TSA :	<i>Transcriptome Shotgun assembly</i>
UMR-PVBMT :	Unité Mixte de Recherche - Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
USDA :	<i>United States department of Agriculture</i>

• Autres abréviations

ACP :	Analyse en composante principale
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNdb :	Acide désoxyribonucléique double brin
AFM :	Analyse factorielle multiple
AlkB :	<i>Alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylase domain</i>

AMtV	Ananas metavirus
AP :	Protéinase aspartate
ARN :	Acide ribonucléique
ARNdb :	Acide ribonucléique double brin
ARNg :	Acide ribonucléique génomique
ARNi :	Acide ribonucléique interférence
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
ARNsb :	Acide ribonucléique simple brin
CIV :	Culture <i>in vitro</i>
CP :	Protéine de capsid
CPm :	Protéine mineure de capsid
CRISPR :	Courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
Cv :	Cultivar
Da :	Dalton
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
dsRNA :	ARN double brin (<i>double-stranded RNA</i>)
DROM :	Départements et régions d'outre-mer
ECV	endogenous caulimovirid
ELISA :	Dosage immuno-enzymatique sur support solide (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
ePBCOV	<i>endogenous pineapple bacilliform comosus virus</i>
ePPRV-1	<i>endogenous pineapple pararetrovirus-1</i>
ePRV	<i>endogenous pararetrovirus</i>
eRTBV	<i>endogenous rice tungro bacilliform virus</i>
GV	<i>grapevine virus</i>
Hel :	Hélicase
HSP70h :	Homologue de la protéine de choc 70
HTS :	Séquençage à haut débit (<i>High-Throughput Sequencing</i>)
IC-RT-PCR :	<i>ImmunoCapture reverse transcriptase PCR</i>
IM-PCR :	<i>ImmunoMagnetic capture PCR</i>
IMC-RT-PCR :	<i>ImmunoMagnetic capture reverse transcriptase PCR</i>
ITK :	Itinéraire technique
LAMP :	Amplification isothermique à médiation par boucle
L-Pro :	<i>Leader papain-like protease</i>

LTR :	Longue répétition terminale
MET :	Microscope électronique à transmission
miRNA :	<i>Micro interfering Ribonucleic Acid</i>
ML :	<i>Maximum-likelihood</i>
MP :	Protéine de mouvement
Mtr :	Méthyltransférase
MWP :	Maladie du dépérissement de l'ananas (<i>Mealybug wilt disease of pineapple</i>)
NGS :	Séquençage de nouvelle generation (<i>Next Generation Sequencing</i>)
Nt :	Nucléotide
ONT :	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
ORF :	Cadre ouvert de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)
ORNQ :	Organisme réglementé non de quarantaine
OTU :	Unités taxonomiques opérationnelles (<i>Operational Taxonomic Unit</i>)
PacBio :	<i>Pacific bioscience</i>
pb :	Paire de bases
PCR :	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PBV	<i>pineapple bacilliform virus</i>
PCV	<i>pineapple closterovirus</i>
PM :	Plante mère
RACE PCR :	Amplification rapide d'extrémités de cDNA par réaction en chaîne par polymérase (<i>Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction</i>)
RCA :	Amplification en cercle roulant
RdRp :	ARN polymérase ARN-dépendante
Rep :	Protéine de Réplication
RNase H :	Ribonucléase H
rRNAd :	ARN total ribodéplété (<i>ribosomal RNA depleted total RNA</i>)
RT :	Transcriptase reverse
RT-PCR :	Réaction de réverse transcription et de polymérisation en Chaîne
RT-qPCR :	Réaction de réverse transcription et de polymérisation en Chaîne en temps réel
SGS :	Deuxième génération de séquençage (<i>Second Generation Sequencing</i>)
sgRNA :	ARN messagers sous-génomiques
siRNA :	Petit ARN interférent (<i>Small interfering Ribonucleic Acid</i>)
SMRT:	<i>Single-molecule real-time sequencing</i>

SNP :	Polymorphisme d'un seul nucléotide (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SOOI :	Sud-ouest de l'océan Indien
SSP :	<i>Strand-switching primer</i>
STDP-PCR :	<i>Single-Tube Dual Primer-PCR</i>
TASPERT :	<i>TArget-SPEcific Reverse Transcript</i>
TBIA :	<i>Tissue blot immunoassay</i>
TGS :	Troisième génération de séquençage (<i>Third generation sequencing</i>)
TIF :	Traitement d'Induction Florale
VANA :	Acides nucléiques associés aux virions (<i>Virion-associated nucleic acids</i>)
VP :	Vitroplant

Liste des Figures

Chapitre 1 - Revue Bibliographique

Figure 1 : Classification actuelle des variétés d'ananas.	3
Figure 2 : Principales structures morphologiques de l'ananas, <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr, et les différents types de rejets.	4
Figure 3 : Origine et routes de dissémination de l'ananas.....	7
Figure 4 : Illustration des cinq principaux groupes commerciaux de cultivars d'ananas.....	8
Figure 5 : Fruit du cultivar 'Queen Victoria' à maturité	9
Figure 6 : Principaux pays producteurs d'ananas dans le monde en 2021.....	10
Figure 7 : Représentation des principales étapes de l'itinéraire technique pour la culture de l'ananas à La Réunion.....	11
Figure 8 : Surfaces des zones de production d'ananas 'Queen Victoria' à La Réunion.....	13
Figure 9 : Photographies : (A) d'un symphyle visible à l'œil nu, et (B) de racines détruites par des nématodes et des symphyles.....	16
Figure 10 : Photographies de : (A) un mâle de <i>Meloidogyne</i> sp, et (B) <i>Rotylenchulus reniformis</i> , vus au microscope (x 400), (C) <i>Pratylenchus brachyurus</i> (x 1600).	17
Figure 11 : Photographies de : (A) <i>Dolichotetranychus floridanus</i> vu à la loupe binoculaire, et (B) traces rouges à la base des feuilles formées par des colonies d'acariens.	18
Figure 12 : Photographies (A) du papillon <i>Strymon</i> sp, (B) de la chenille sur la face inférieure d'une feuille d'ananas, et (C) de la chenille foreuse de l'ananas provoquant une gommose	18
Figure 13 : Cochenille diaspine de l'ananas.	19
Figure 14 : Cochenilles farineuses (A) <i>Dysmicoccus brevipes</i> , (B) <i>Dysmicoccus neobrevipes</i> , et (C) Association mutualiste entre les fourmis et les cochenilles.	20
Figure 15 : Les maladies causées par <i>Ceratocystis paradoxa</i>	20
Figure 16 : Plants d'ananas infectés par <i>Phytophthora</i> sp.....	22
Figure 17 : Symptômes de (A) fusariose, et de (B) tache noire sur ananas.....	22
Figure 18 : Symptômes de la pourriture bactérienne du cœur, ou 'heart rot'	23
Figure 19 : Cylindre d'ananas infectés par <i>Gluconobacter oxydans</i> , (A) frais et (B) cuit.....	24
Figure 20 : Symptômes typique sur fruit du 'Marbling'	24
Figure 21 : Organisation génomique des ampelovirus infectant l'ananas.....	26
Figure 22 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les virus et les genres viraux de la famille <i>Closteroviridae</i> sur la base de comparaisons de la séquence de la protéine HSP70h.	27
Figure 23 : Organisation du génome des badnavirus infectant l'ananas.....	29
Figure 24 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences de virus des différents genres de la famille <i>Caulimoviridae</i>	30
Figure 25 : Organisation du génome des pineapple secovirus A (PSVA), PSVB, PSVC, et PSVD	32
Figure 26 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les espèces et les genres de la famille des <i>Secoviridae</i>	32

Figure 27 : Taches jaunes sur feuilles et nécroses sur fruit provoquées par le TSWV sur ananas.	33
Figure 28 : Méthodes de caractérisation des viromes de communautés végétales.....	37
Figure 29 : Représentation schématique d'une cellule végétale infectée par un phytovirus, illustrant la diversité des acides nucléiques pouvant servir de cible aux approches métagénomique.	38
Figure 30 : Principe de séquençage HTS de la technologie Illumina.....	43
Figure 31 : Principe du séquençage Nanopore.	45
Figure 32 : Représentation schématique d'un <i>pipeline</i> décrivant les étapes principales d'une étude de séquençage HTS.	46
Figure 33 : Représentation schématique du principe d'assemblage des <i>reads</i>	47
Figure 34 : Signalements de la MWD dans le monde.	49
Figure 35 : Symptômes typiques de la MWD sur feuilles d' <i>Ananas comosus</i> : (A) rougissement, (B) jaunissement, (C) incurvation, (D) flétrissement, et (E) dessèchement de l'extrémité des feuilles.....	51
Figure 36 : Particules virales de (A) PMWaV2 et de (B) PMWaV2 et PBCOV, observées au microscope électronique à transmission dans des plants présentant des symptômes de MWD.....	54
Figure 37 : Cochenille potentiellement impliquée dans la MWD : <i>Pseudococcus longispinus</i>	58
Figure 38 : Plant d'ananas (A) asymptomatique infecté par le PMWaV1, et organisation de son génome, (B) symptomatique infecté par le PMWaV2, présentant des symptômes de flétrissement typiques, et organisation de son génome.	62
Figure 39 : Étapes de la micropropagation d'ananas : (A) multiplication, (B) isolement, et (C) acclimatation en serre.....	67

Chapitre 2 - La maladie du 'wilt' à La Réunion

Article 2

Figure 1 : Distribution géographique des 15 parcelles d'ananas visitées lors de l'enquête réalisée en 2020 sur l'île de La Réunion.	87
Figure 2 : Photographies des principaux symptômes décrits sur les feuilles d'ananas infectés par la MWD	88
Figure 3 : Histogrammes des pourcentages (échelle en probabilité avec 1,0 = 100%) des effectifs cumulés de présence de chaque symptôme.....	95
Figure 4 : Diagramme de Venn représentant la fréquence de chaque infection et combinaison d'infection mixte de virus dans les plants d'ananas indexés.	97
Figure 5 : Description des quinze parcelles prospectées à La Réunion en fonction de différents groupes de variables : (A) en vert, ITK ; (B) en bleu, fréquence d'infection par chacun des virus; et (C) en marron, fréquence d'observation des différents symptômes	99
Figure 6 : Analyse en composante principale (ACP) normée sur la présence des symptômes et des virus sur les plants d'ananas	100

Chapitre 3 - Apport de la métagénomique pour le diagnostic des virus de l'ananas

Figure 45 : Protocole de préparation de l'ARN <i>via</i> le kit cDNA-PCR barcoding (SQK-PCB109) de chez Oxford Nanopore Technologies utilisé pour le séquençage au MinION de l'ARN total d'ananas.....	122
Figure 46 : Comparaison du rendement (en vert, mesuré en µg) et de la qualité (en jaune, noté RIN) des ARN, en fonction du mode de broyage (sachet ou azote), et des kits d'extraction (en abscisse), pour les échantillons (A) P4, et (B) P8.....	126
Figure 47 : Mesure de (A) la qualité (estimée par la mesure du RIN), et (B) la quantité (rendement) de l'ARN total extrait, selon le type de broyage à l'azote liquide (bleu) ou au broyeur à bille en sachet type ELISA (orange), et selon le mode de conservation de l'échantillon (-80°C ou +4°C).	127
Figure 48 : Assignation des <i>reads</i> sur le génome de l'ananas (en rose, sans les ARN ribosomiques), les ARN ribosomiques de l'ananas (en vert) et les ARN viraux (en bleu) en fonction de la taille des <i>reads</i> , après utilisation du kit cDNA-PCR barcoding, et séquençage <i>long reads</i> au MinION.....	128
Figure 49 : Représentation schématique linéarisée de l'organisation du génome du PBCOV sur ananas.	133
Figure 50 : Arbres phylogénétiques de <i>Maximum-likelihood</i> basés sur l'alignement de séquences nucléotidiques correspondant aux domaines RT-RNaseH1, montrant (A) le placement du PBCOV, au sein du genre <i>Badnavirus</i> , et (B) l'isolat de La Réunion au sein des séquences de PBCOV.	134
Figure 51 : Organisation du génome du <i>Sadwavirus</i> infectant l'ananas : pineapple secovirus A (PSVA).	135
Figure 52 : Arbres phylogénétiques de <i>Maximum-likelihood</i> basés sur l'alignement des séquences d'acides aminés correspondant aux domaines Pro-Pol, montrant le placement de l'isolat réunionnais du PSVA (A) au sein du genre <i>Sadwavirus</i> , et (B) au sein de l'ensemble des séquences de <i>Sadwavirus</i>	136
Figure 53 : Pourcentage de couverture des génomes viraux supérieur à dix <i>reads</i> , en fonction du nombre de bases séquencées pour l'approche A) rRNA, B) <i>long reads</i> , C) dsRNA et D) siRNA.	140

Article 4

Figure 1 : Schematic representation of the six ampelovirus genomes assembled in this work.....	158
Figure 2 : <i>Maximum-likelihood</i> phylogenetic tree showing the relationships of pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaV1 to 6) amino acid sequences with selected members of the <i>Ampelovirus</i> genus corresponding to the RdRp (A), HSP70h (B) and CP (C) proteins.....	160
Figure 3 : <i>Maximum-likelihood</i> phylogenetic tree of the HSP70h amino acid sequences of pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (A), 2 (B) and 3 (C) from Reunion Island	161
Figure 4 : Mean sequencing depth for short reads (red curves) and long reads (blue curves) along the genome of PMWaV1 (A), PMWaV2 (B), PMWaV3 (C), PMWaV5 (D), PMWaV6 (E), PMWaV7 (F).	163
Figure 5 : Proportion of viral bases per millions of sequenced bases for each pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs) for the short (A) and long reads (B) approaches, and interpolation of sequence coverage (10X, y-axis) for each PMWaVs for the short (C) and long (D) reads approaches according to the number of sequenced bases (x-axis in Log10 scale).	164

Liste des Tableaux

Chapitre 1 - Revue Bibliographique

Tableau 1 : Principales caractéristiques des virus connus chez l'ananas.....	25
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents types de matrices de séquençage pour la métagénomique virale.	39
Tableau 3 : Comparaison des performances de quatre plateformes de séquençage HTS.	42

Chapitre 2 - La maladie du 'wilt' à La Réunion

Article 2

Table 1 : Suivi de la contamination des rejets d'ananas issus de VP entre 2016 et 2021 sur l'île de La Réunion	89
Table 2 : Description des symptômes présents sur les VP séquencés en HTS, et résultats des analyses de l'assemblage <i>de novo</i> et du BLASTn.....	91
Table 3 : Effectifs (<i>Effectif</i>) et pourcentages (<i>Percentage</i>) de plants d'ananas sur lesquels ont été observés les symptômes en fonction de la détection de chaque virus.....	102
Table supplémentaire 1 : Description générale des parcelles d'ananas visitées sur l'île de La Réunion.....	111
Table supplémentaire 2 : Effectif (<i>Percentage</i>) de présence des différents symptômes et des cochenilles pour chaque parcelle.....	112
Table supplémentaire 3 : Effectif (<i>Percentage</i>) de plants infectés respectivement par le PMWaV1, 2, 3 et PBCOV dans chaque parcelle.....	112
Table supplémentaire 4 : Probabilité de présence théorique des virus seuls et résultat du test exact de Fisher pour la comparaison des effectifs théoriques et observés des différentes combinaisons de virus.....	113

Chapitre 3 - Apport de la métagénomique pour le diagnostic des virus de l'ananas

Tableau 4 : Principes et cibles des six modalités d'extractions d'acide nucléiques testés.....	120
Tableau 5 : Caractéristiques et assignations des <i>reads</i> obtenus après séquençage au MinION selon les différentes modalités de préparation des ARN.....	129
Tableau 6 : Longueurs, nombre de lectures, couverture et résultats de l'analyse BLASTx sur les contigs co-assemblés avec les <i>short</i> et <i>long reads</i> sur ananas.....	132
Tableau 7 – Nombre de <i>reads</i> viraux par million de <i>reads</i> séquencés, pour chaque virus, et chaque approche HTS.	138

Article 3

Supplementary Table 1 – List of sequences used in pairwise identity comparisons and phylogenetic analysis. 148

Supplementary Table 2 – Percent nucleotide and amino acid identities with pineapple vitivirus A for related vitiviruses in RAP and CP genes. 149

Article 4

Table 1 : Characteristics of the contigs with similarities to ampeloviruses. 157

Table 2 : Pairwise nucleotide and deduced amino acid sequence identities of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp), heat shock protein 70 homolog (HSP70h) and coat protein (CP) between the Reunion isolates of PMWaVs and their closest ampelovirus relative..... 159

Table 3 : Read mapping statistics with short and long read approaches of the Reunion isolates of PMWaVs genomic sequences. 162

Supplementary Table 1 : Sequence of the primers used in RT-PCR assays for the detection of PMWaVs. 171

Supplementary Table 2 : Identification of the 5' and 3' ends of the genome sequences of PMWaV species using RACE PCR and long read approaches..... 171

Supplementary Table 3 : Genomic organization of PMWaV sequences described on pineapple in Reunion. 171

Supplementary Table 4 : List of sequences used for pairwise identity comparisons and phylogenetic analysis. 172

Table des matières

Chapitre 1 - Revue bibliographique.....	1
Contexte général.....	1
1 - L'ananas.....	2
1.1 Taxonomie et classification.....	2
1.2 Caractéristiques morphologiques et biologiques.....	3
1.3 Histoire et distribution géographique.....	6
1.4 Les différents cultivars.....	7
1.5 La culture de l'ananas.....	9
1.5.1 Production.....	9
1.5.2 Itinéraires techniques et cycle cultural.....	11
1.5.3 Particularités de la filière réunionnaise.....	12
2 – Principales maladies non virales et bioagresseurs de l'ananas.....	14
2.1 Les maladies abiotiques.....	15
2.2 Les bioagresseurs.....	15
2.2.1 Symphytes.....	16
2.2.2 Nématodes.....	17
2.2.3 Acariens.....	17
2.2.4 Insectes.....	18
2.2.5 Champignons.....	20
2.2.6 Bactéries.....	23
3 – Les virus décrits sur ananas.....	25
3.1 Ampelovirus.....	25
3.2 Badnavirus.....	28
3.3 Sadwavirus.....	31
3.4 Orthotospovirus.....	33
4 – Diagnostic des maladies virales de l'ananas : apport de la technologie HTS.....	34
4.1 Diagnostic moléculaire des virus de l'ananas.....	34
4.2 Apport des HTS.....	35

4.2.1 La métagénomique virale	36
4.2.2 Types d'acides nucléiques utilisables en métagénomique virale.....	38
4.2.3 Les techniques de séquençage haut débit	42
4.2.4 Traitement bio-informatique des données de séquençage.....	46
5 - La maladie dite du 'wilt' de l'ananas ou MWD	48
5.1 Distribution géographique de la MWD	49
5.2 Symptômes de la MWD	49
5.3 Epidémiologie et incidence de la MWD	52
5.4 Etiologie de la MWD	54
5.4.1 Virus associés à la MWD : les différentes hypothèses	54
5.4.2 Rôle des cochenilles farineuses dans la MWD	57
5.4.3 Rôle des fourmis dans la MWD	60
5.4.4 Rôle des supprimeurs d'ARN <i>silencing</i> dans l'étiologie de la MWD.....	61
5.4.5 Le phénomène de rémission naturelle.....	62
5.4.6 MWD : maladie ou syndrome ?.....	63
5.5 La MWD à La Réunion	64
5.6 Gestion et contrôle de la MWD.....	65
5.7 La culture <i>in vitro</i> de l'ananas : vers un assainissement du matériel végétal	67
6 – Problématiques scientifiques et objectifs de travail	68
Chapitre 2 - La maladie du 'wilt' à La Réunion.....	73
Article 1.....	79
Article 2.....	83
1 - Introduction.....	84
2 - Matériels et méthodes.....	86
Enquête de terrain.....	86
Suivi de parcelles de Vitroplants.....	89
Extraction des acides nucléiques	89
Indexation moléculaire des principaux virus de l'ananas.....	90
Séquençage haut débit	91
Analyses statistiques.....	93

3 - Résultats	95
3.1 Enquête : état sanitaire des parcelles d’ananas à La Réunion	95
Présence des symptômes de la MWD et des cochenilles	95
Prévalence des virus.....	96
Co-occurrence.....	97
3.2 Enquête : analyses préliminaires d’association symptômes/virus en fonction de l’itinéraire technique	98
3.3 Enquête : étude de la relation présence de symptômes/présence de virus dans la MWD	100
Relation globale entre symptômes et virus au niveau de la parcelle	100
Influence des virus sur la symptomatologie.....	101
3.4 Étude de l’intérêt de l’utilisation des VP.....	104
3.5 Évaluation de la présence d’autres virus récemment décrits sur ananas	104
4 – Discussion	105
État sanitaire des parcelles réunionnaises.....	105
Effet de synergie entre les virus	107
Évaluation d’une potentielle corrélation symptômes/virus	107
Assainir les cultures d’ananas par l’utilisation de vitroplants	109
Conclusion	110
Figures et tableaux supplémentaires	111

Chapitre 3 - Apport de la métagénomique pour le diagnostic des virus de l’ananas.....	117
1 - Matériels et méthodes	119
2 - Comment préparer des extraits d’ARN totaux d’ananas en vue du séquençage haut débit ?	125
2.1 - Comparaison de six modalités d’extraction d’ARN	125
2.2 - Effet de la conservation à -80°C sur l’extraction d’ARN	127
3 – Optimisation de la proportion du nombre de reads viraux en vue du séquençage <i>long reads</i>	128
4 – Caractérisation moléculaire et étude phylogénétique des virus de l’ananas à La Réunion	130
4.1 – Identification de virus connus et nouveaux sur l’ananas	131

4.2 – Pineapple baciliform CO virus (PBCOV)	132
4.3 – Pineapple secovirus A (PSVA)	135
5 – Analyses comparative de cinq techniques de séquençage à haut débit	137
6 – Conclusion	142
Article 3	145
Article 4	153
1 - Introduction	153
2 - Materials and Methods	154
2.1 Plant Material	154
2.2 RNA extraction.....	155
2.3 High-throughput sequencing	155
2.4 Data analysis and assembly of viral genomes	155
2.5 Detection of PMWaVs by RT-PCR	156
2.6 RACE PCR.....	156
2.7 Search for recombination and phylogenetic analysis	156
3 - Results	157
3.1 Identification of known and novel ampeloviruses.....	157
3.2 Species identification and genome organization	158
3.3 Phylogenetic analysis	160
3.4 Comparison between the short and long read approaches.....	162
4 - Discussion	165
5 - Conclusion	166
Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives	175
La MWD, une énigme étiologique	175
Les virus et leur pacte d’alliance	175
Mutualisme : le traité plante/virus.....	176
A la recherche de corrélations entre symptômes de la MWD et présence virale	177
MWD : maladie ou syndrome?	178

Caractérisation du virome de l’ananas par des approches innovantes de métagénomique virale..... 179

Diagnostic métagénomique viral : avantages et inconvénients des HTS 179

Evaluation d’approches de séquençage haut débit pour le diagnostic des virus d’ananas 180

Vers des approches de diagnostic haut débit des virus d’ananas basés sur le HTS..... 181

Apports et limites du diagnostic virologique par HTS pour l’application de la réglementation des organismes nuisibles..... 181

Apports des approches de HTS pour étudier la diffusion et l’évolution des virus d’ananas à l’échelle mondiale 183

Diversité et dissémination des virus d’ananas à la Réunion..... 183

Voyager dans le passé grâce aux ARN anciens..... 183

Stratégies de gestion de la MWD pour assurer la durabilité de la filière ananas 184

Proposer un itinéraire technique adapté à la maîtrise de la MWD 185

Les vitroplants : une arme pour lutter contre la MWD ?..... 186

Références bibliographiques.....191

Annexes.....213

Annexe 1.....213

Annexe 2.....214

Annexe 3.....215

Chapitre 1

Revue bibliographique



Scene on a pineapple plantation, with harvested pineapples (Hawaii, 1910)
(Source <https://loc.getarchive.net/media/scene-on-a-pineapple-plantation-with-harvested-pineapples-hawaii>
Frank G. Carpenter collection, public domain photograph)

Contexte général

Dans le vaste paysage de l'agriculture moderne, les **phytovirus**, pourtant minuscules et invisibles à l'œil nu, se dressent comme des défis majeurs auxquels les producteurs et les chercheurs font face à travers le monde. Le changement climatique et les pressions exercées par la population humaine entraînent des modifications rapides des pratiques agricoles et des systèmes de culture qui favorisent l'apparition de **maladies virales** destructrices (Jones and Naidu, 2019). Ces maladies virales ne se contentent pas de causer des pertes économiques importantes, en altérant la qualité et le rendement des récoltes, mais elles mettent également en péril la disponibilité des produits alimentaires et la durabilité de la production agricole (Jones, 2021). De plus, les virus ont évolué pour **interagir** avec leurs hôtes de multiples façons, allant de la **neutralité** à la **mutualisation**, en passant par des interactions **synergiques complexes**, pouvant influencer le développement des maladies chez les plantes (Fraile and García-Arenal, 2016; Roossinck, 2011).

Dans ce contexte, émerge également le concept '**One Health**' qui souligne l'interconnexion étroite entre la santé humaine, animale et environnementale (Andrison *et al.*, 2022). En agriculture, les maladies virales ne peuvent être isolées des enjeux sanitaires et environnementaux plus larges. Leur impact sur les cultures peut avoir des répercussions en cascade, affectant la sécurité alimentaire, les moyens de subsistance et la santé humaine (Singh *et al.*, 2023).

Au cours des dernières décennies, l'évolution rapide des techniques de diagnostic et de surveillance a permis une meilleure compréhension des interactions entre les plantes hôtes, les virus et les vecteurs. Les avancées dans les méthodes de **métagénomique**, en particulier, avec les approches **sans a priori**, ont ouvert de nouvelles perspectives passionnantes pour la détection et la caractérisation des virus dans les agrosystèmes (Edwards and Rohwer, 2005; Stobbe and Roossinck, 2014). Cette approche globale a permis de révéler l'ampleur de la **diversité virale** et l'existence de nombreux virus, souvent présents sans provoquer de symptômes visibles (Roossinck *et al.*, 2015). De plus, le paysage viral en constante évolution est marqué par l'émergence de nouveaux virus et variants, créant des défis

supplémentaires pour la gestion des maladies virales (Anderson *et al.*, 2004; Hilaire *et al.*, 2022).

Pour illustrer ces concepts, ces travaux de thèse se penchent spécifiquement sur la **maladie du dépérissement de l'ananas à La Réunion**. En explorant l'étiologie de cette maladie et la diversité virale chez l'ananas, ce travail contribue à éclairer les **interactions complexes** qui déterminent la santé des cultures, et met en évidence l'importance d'une compréhension approfondie des maladies pour un contrôle plus efficace de ces dernières, afin de garantir la durabilité des systèmes agricoles dans un contexte de changements globaux.

1 - L'ananas

1.1 Taxonomie et classification

L'ananas, est une monocotylédone herbacée appartenant à la classe des *Liliatae*, à la famille des *Bromeliaceae*, à la sous-famille des *Bromelioideae*, et au genre *Ananas*, espèce ***Ananas comosus var. comosus*** (L.) Merr (Bartholomew *et al.*, 2003). C'est une plante tropicale pérenne, xérophile, adaptée à une très large gamme d'habitats (Krauss, 1948).

La première description botanique de l'ananas cultivé a été réalisée par Charles Plumier à la fin du XVIIe siècle, lorsqu'il a créé le genre *Bromelia*, en honneur à un botaniste suédois Olof Bromelius. Depuis la classification binomiale de l'*A. comosus* par Merrill en 1917 (Merrill, 1917), le genre a subi de nombreuses révisions de classification, dont celle de Smith et Down (Smith and Downs, 1979), qui a été modifiée par Leal (1990), pour inclure sept espèces dans le genre *Ananas*, ainsi que la création du genre monospécifique *Pseudoananas*. Ces espèces sont : *A. comosus*, *A. lucidus*, *A. parguazensis*, *A. nanus*, *A. ananassoides*, *A. bracteatus*, *A. fritzmuelleri* et *P. sagenarius*. En 1998, Leal *et al.* (Leal *et al.*, 1998), ont proposé que ces espèces soient condensées en un seul genre *Ananas*, composé de deux espèces, *A. comosus* et *A. macrodontes*. Les sept espèces précédentes sont classées comme des variétés botaniques, et *P. sagenarius* est renommé *A. macrodontes* (**Figure 1** ; (d'Eeckenbrugge and Leal, 2003)). La liste suivante

résume ces changements reliant la nouvelle classification à l'ancienne (entre parenthèse) :

- *Ananas comosus* var. *ananassoides* (*Ananas ananassoides* et *Ananas nanus*)
- *Ananas comosus* var. *bracteatus* (*Ananas bracteatus* et *Ananas fritzmulleri*)
- *Ananas comosus* var. *comosus* (*Ananas comosus*)
- *Ananas comosus* var. *erectifolius* (*Ananas lucidus*)
- *Ananas comosus* var. *parguazensis* (*Ananas parguazensis*)
- *Ananas macrodontes* (*Pseudananas sagenarius*)

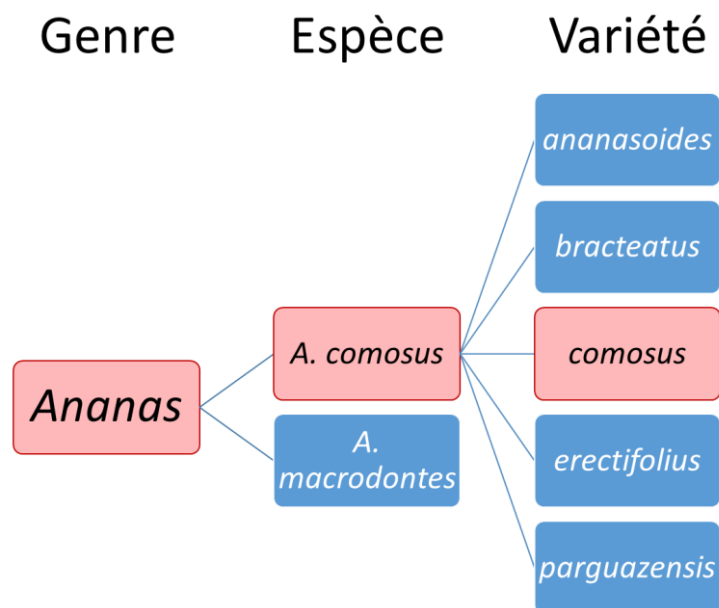


Figure 1 : Classification actuelle des variétés d'ananas.

La classification actuelle se base sur des critères morphologiques (Duval *et al.*, 1995), biochimiques (Garcia, 1988) et génétiques, à l'aide de marqueurs moléculaires (d'Eeckenbrugge and Leal, 2003; de Fátima Ruas *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2001).

1.2 Caractéristiques morphologiques et biologiques

Les principales structures morphologiques distinctives de cette herbacée sont l'inflorescence, le fruit multiple, la tige, les feuilles, les racines et les rejets (**Figure 2**).

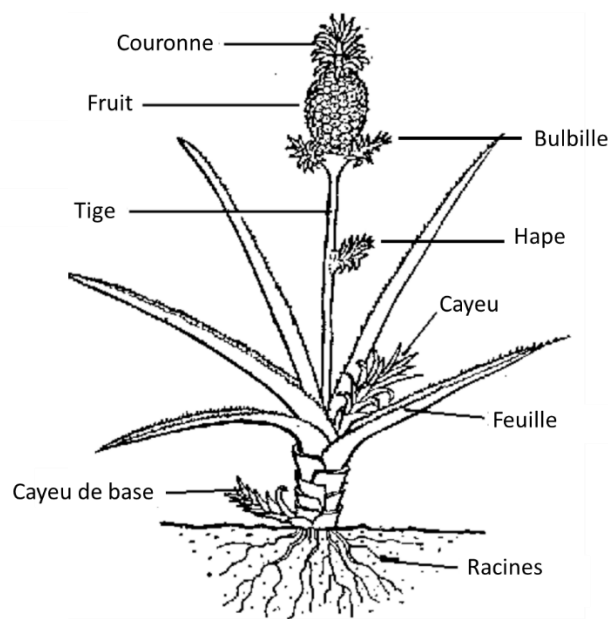


Figure 2 : Principales structures morphologiques de l'ananas, *Ananas comosus* (L.) Merr, et les différents types de rejets. D'après (PineProj, 2005)

La plante adulte mesure entre 1-2 mètres de haut, pour un diamètre équivalent selon les cultivars (Sether, 2005). L'inflorescence terminale est à l'origine d'un fruit composé, constitué de plusieurs fleurs soudées, nommé syncarpe (d'Eeckenbrugge and Leal, 2003; German *et al.*, 1992). La plante adulte compte environ 40 à 70 feuilles épaisses disposées en cercles concentriques autour de la tige, nommée rosette. Les feuilles présentent des phénotypes variés permettant une distinction aisée des cultivars. Le système racinaire est de type traçant et s'établit sur une profondeur n'excédant pas 35 centimètres (Fournier, 2012). Les ananas poussent dans la plupart des types de sol ayant un drainage adéquat, et dans les climats tropicaux, mais la croissance des plantes et la taille des fruits varient considérablement selon les conditions environnementales (d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997).

Les variétés cultivées sont pour la plupart autostériles. De ce fait, la production de graines est majoritairement obtenue dans le cadre des programmes de sélection par le biais de croisements entre différentes variétés. L'ananas se multiplie naturellement, après la production du fruit, par **multiplication végétative** à partir du méristème terminal (donnant naissance à la couronne), ou à partir des bourgeons axillaires (qui forment des rejets latéraux sur la tige et le pédoncule ou drageons) capables de produire un nouveau fruit (d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997).

Il y a **cinq catégories de rejets (Figure 2)**:

- 1) La **couronne**, qui se trouve au sommet du fruit dans un état dormant et qui, une fois plantée, reprend son développement.
- 2) Le **cayeu de base**, qui prend naissance sur la partie souterraine de la tige ou sur le collet de la plante. Il émet des racines qui pénètrent dans le sol et possède en général des feuilles plus longues. Ce cayeu de base est souvent appelé 'rejeton', ou 'drageon', ou encore rejet de souche.
- 3) La **bulbille**, qui prend naissance à la base du fruit. Elle se développe à partir d'un bourgeon axillaire du pédoncule. Après la récolte du fruit, son développement s'arrête et elle tombe sur le sol. Parfois des bulbilles de couronne naissent à l'aisselle de la couronne. La bulbille constitue le meilleur matériel végétal pour la multiplication de l'ananas car elle assure un cycle très régulier. Mais elle est rare, une seule par pied en général.
- 4) Le **hape**, qui est un rejet intermédiaire entre le cayeu et la bulbille. Il se développe à partir de bourgeon axillaire, et est situé à la jonction de la tige et du pédoncule du fruit.
- 5) Le **cayeu**, qui prend naissance à partir du bourgeon axillaire de la tige. Son bourgeon terminal est semblable à la tige. C'est lui qui assure la seconde récolte sur le même pied. Le cayeu est le plus couramment utilisé comme matériel végétal dans les cultures industrielles.

Pour renouveler une plantation, les producteurs utilisent ces rejets ou ces couronnes de la culture précédente. Dans les plantations commerciales, les plantes produisent au maximum deux ou trois fruits, à cause de la réduction de la taille des fruits d'un cycle sur l'autre, mais en grande majorité la plantation est arrachée après un cycle.

D'un point de vue génétique, la multiplication végétative est un mode de multiplication asexuée qui engendre de nouveaux individus possédant le même génome (Reinhardt *et al.*, 2018). Ce sont donc des clones qui possèdent les mêmes caractéristiques que la plante mère. Cette multiplication végétative peut être naturelle, comme c'est le cas pour l'ananas avec la production des différents rejets, ou artificielle, *via* la culture *in vitro* permettant la production de **vitroplants** (VP). L'avantage est l'obtention d'une descendance homogène, mais l'inconvénient est l'absence de brassage génétique, empêchant l'évolution de l'espèce et réduisant ses capacités d'adaptation au milieu au fur et à mesure des générations. De plus,

la multiplication végétative favorise la **transmission verticale** des virus des pieds mères vers les pieds filles et l'**accumulation des virus** au fil des générations, qui peut aboutir à une érosion des rendements (Aimone *et al.*, 2021; Pagán *et al.*, 2014).

1.3 Histoire et distribution géographique

En novembre 1493, Christophe Colomb réalise son second voyage d'exploration vers les Amériques, où il va découvrir l'ananas, en même temps que la Guadeloupe. La tranche d'ananas était un cadeau de bienvenue offert par les indigènes aux navigateurs, afin qu'ils se désaltèrent après leur long voyage. Des plants seront par la suite introduits en Europe, et notamment cultivés dans les serres du château de Versailles. Le nom du genre '*Ananas*' est dérivé du mot '*nana nana*' qui vient de la langue amérindienne tupi-guarani, signifiant le 'parfum des parfums'. Les explorateurs espagnols nommèrent l'ananas '*Piña*' de par sa ressemblance à une pomme de pin. Les anglais ajoutèrent '*apple*' pour l'associer aux fruits juteux et délicieux (Beuman, 2006; d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997; Loison-Cabot, 1992). Quant au nom latin d'espèce '*comosus*', signifiant 'chevelu ou doté d'une abondante chevelure', il fait référence à la touffe de feuilles située sur le fruit et nommée couronne.

Son **origine** a été retracée en Amérique du Sud, dans la région couvrant le centre et le sud du **Brésil**, le nord de **l'Argentine** et le **Paraguay**, sa culture étant limitée aux régions tropicales (Paull and Duarte, 2011; Zanella *et al.*, 2012). Lors de la conquête de l'Amérique par les Européens, l'ananas était cultivé dans toutes les plaines néotropicales, depuis la Mésoamérique et les Antilles vers le sud, jusqu'au Paraguay et la côte Pacifique du Pérou. Il était largement répandu dans le Nouveau Monde, des milliers d'années avant que Christophe Colomb ne le découvre et ne répande sa culture dans le monde entier par les voies de navigation (Collins, 1960). Les ananas furent introduits en Afrique par les Européens dès le début du XVI^e siècle (1655 pour l'Afrique du sud), en passant au préalable par le sud de l'Inde en 1548 (**Figure 3**). Avant la fin du XVI^e siècle, on les retrouvait en Chine, à Java et aux Philippines. Au cours des 400 années qui ont suivi, l'*A. comosus* et ses nombreuses variétés ont été cultivées dans diverses régions tropicales et subtropicales. A La Réunion, le cultivar '*Queen victoria*' aurait été introduit vers la fin du XVII^e siècle (1668) (Fournier, 1995).

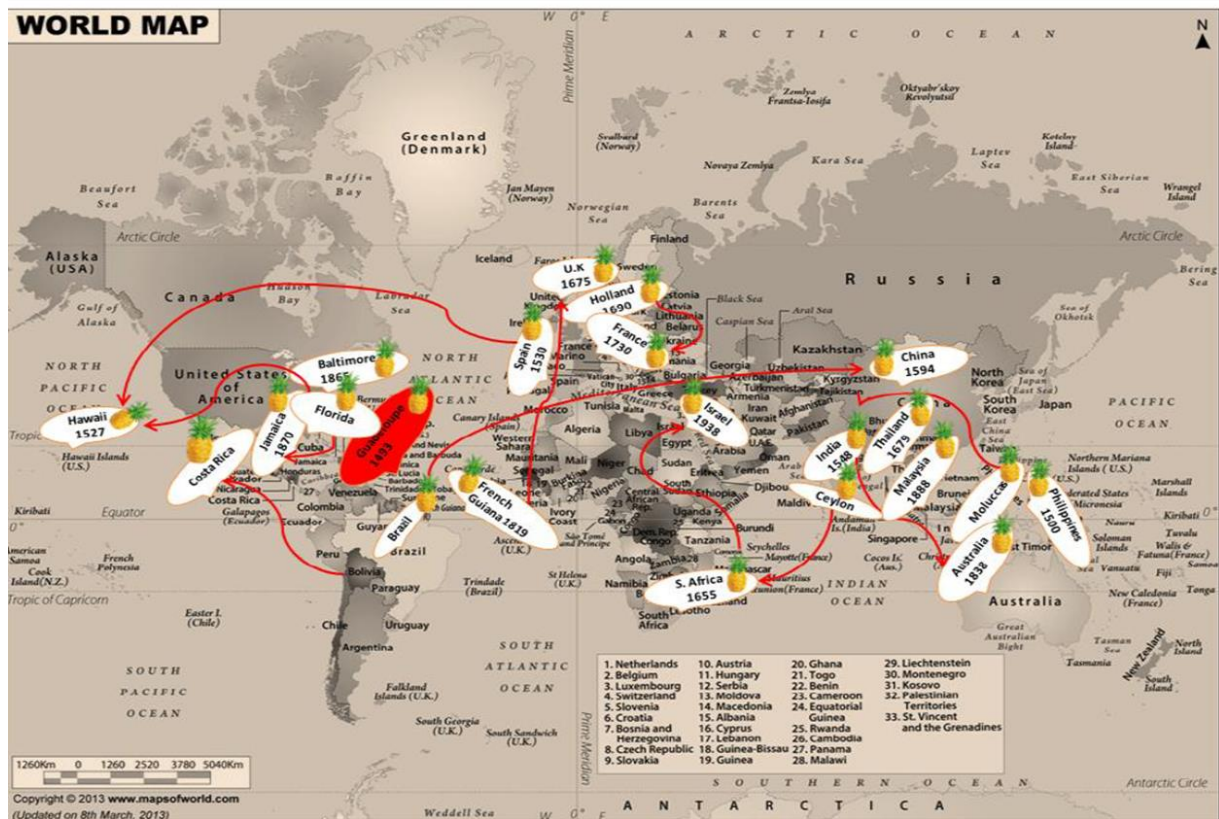


Figure 3 : Origine et routes de dissémination de l'ananas. (Joy and Anjana, 2015)

Les études utilisées pour la classification actuelle des Broméliacées ont permis de proposer le **bouclier guyanais**, région étendue entre la **Colombie** et le nord du **Bésil**, comme lieu de **domestication** de l'ananas. Des travaux sur l'ADN chloroplastique ont permis de resserrer la zone de domestication à la partie orientale du bouclier (Duval *et al.*, 2003). Les formes sauvages étaient cueillies dans la nature puis transférées dans les jardins domestiques, où les plus beaux spécimens étaient échangés parmi la population. Cet échange à long terme soutient l'hypothèse selon laquelle les *Ananas var. comosus* ont été domestiqués à partir d'un variant dérivé des *Ananas var. ananassoides*, par sélection de fruits avec des syncarpes nettement plus grands. La divergence entre l'ananas sauvage et l'ananas cultivé se situerait entre 6 000 et 10 000 ans avant notre ère.

1.4 Les différents cultivars

Parmi les *Bromeliaceae*, l'*Ananas comosus* est la plante la plus importante économiquement, l'espèce *A. comosus var. comosus* étant la seule à avoir une

valeur commerciale. Cette espèce a été divisée commercialement en cinq groupes de cultivars, selon des critères morphologiques (port de la plante, forme du fruit et des yeux, importance des bractées, caractéristique de la chair et des feuilles avec ou sans épines), à savoir '*Cayenne*', '*Spanish*', '*Queen*', '*Pernambuco*' et '*Perolera*' (ou '*Mordilona*') (**Figure 4**) (Paull and Duarte, 2011; Py *et al.*, 1987).

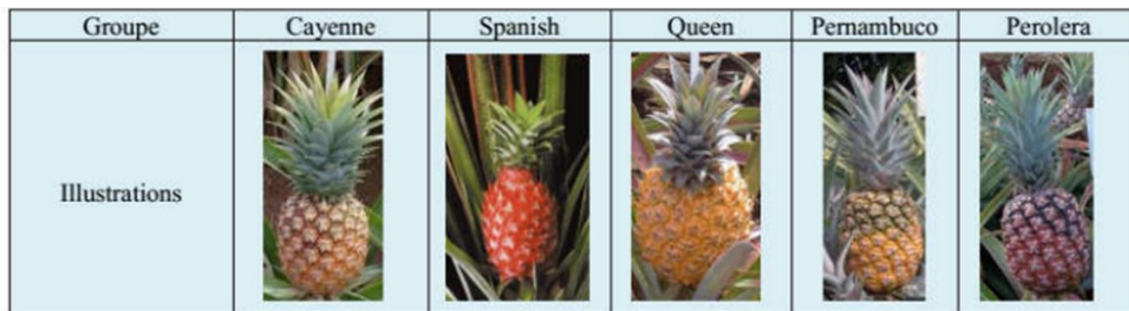


Figure 4 : Illustration des cinq principaux groupes commerciaux de cultivars d'ananas.
(Koffi *et al.*, 2017)

Hawaï fut le centre de distribution mondial des ananas au cours de la première moitié du XXe siècle. Le *Pineapple Research Institute* (PRI) d'Hawaï a initié la création de nouvelles variétés (comme le MD-2) dans les années 1960 dans le but de générer une plus grande diversité de cultivars et de créer des variétés résistantes aux maladies (Chan *et al.*, 2003). On estime qu'il existe actuellement plus de **100 variétés** d'ananas dans le monde, avec des différences significatives en termes de goût, de texture, de taille et de couleur, mais finalement, seulement quatre sont réellement commercialisées. Dans le groupe du cv '*Cayenne*', la variété hybride '*MD-2*' domine le marché mondial depuis le début du millénaire, suivie de la variété '*Cayenne lisse*' qu'elle a supplantée (Bartholomew *et al.*, 2012) car elle répond mieux aux demandes du marché : acidité plus faible et meilleure résistance au froid et au transport des fruits, feuilles lisses, croissance vigoureuse et rapide permettant de réduire la durée du cycle de production et d'augmenter les rendements.

Les deux autres variétés largement commercialisées sont le '*Queen*', plus petit et plus parfumé, et l'ananas '*Bouteille*', dont les fruits ont une forme allongée et conique. Les fruits de ces deux variétés ont un fort taux de sucre (degré Brix) et une faible acidité. Ils sont commercialisés essentiellement sur les marchés locaux pour la consommation en frais car ils ne supportent ni la conservation au froid ni la durée du transport en bateau nécessaires pour atteindre les marchés européen ou nord-américain. Le cultivar '*Queen Victoria*' (**Figure 5**) produits des plantes

plus grande que le cultivar 'Queen'. La pulpe de ses fruits est jaune dorée et présente une excellente saveur sucrée.



Figure 5 : Fruit du cultivar 'Queen Victoria' à maturité. (Source : D. Massé)

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cultivar 'Queen Victoria' qui représente l'essentiel de la production d'ananas sur l'île de La Réunion.

1.5 La culture de l'ananas

1.5.1 Production

L'ananas est la seule espèce de la famille des Broméliacées cultivée commercialement pour la production de fruits, bien que d'autres soient cultivées pour les marchés ornementaux (d'Eeckenbrugge and Leal, 2003; d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997). Depuis 1960, date à laquelle Hawaï produisait 70% de la consommation mondiale (Collins, 1960), la production de l'ananas s'est étendue à toutes les **zones intertropicales** chaudes et humides (**Figure 6**).

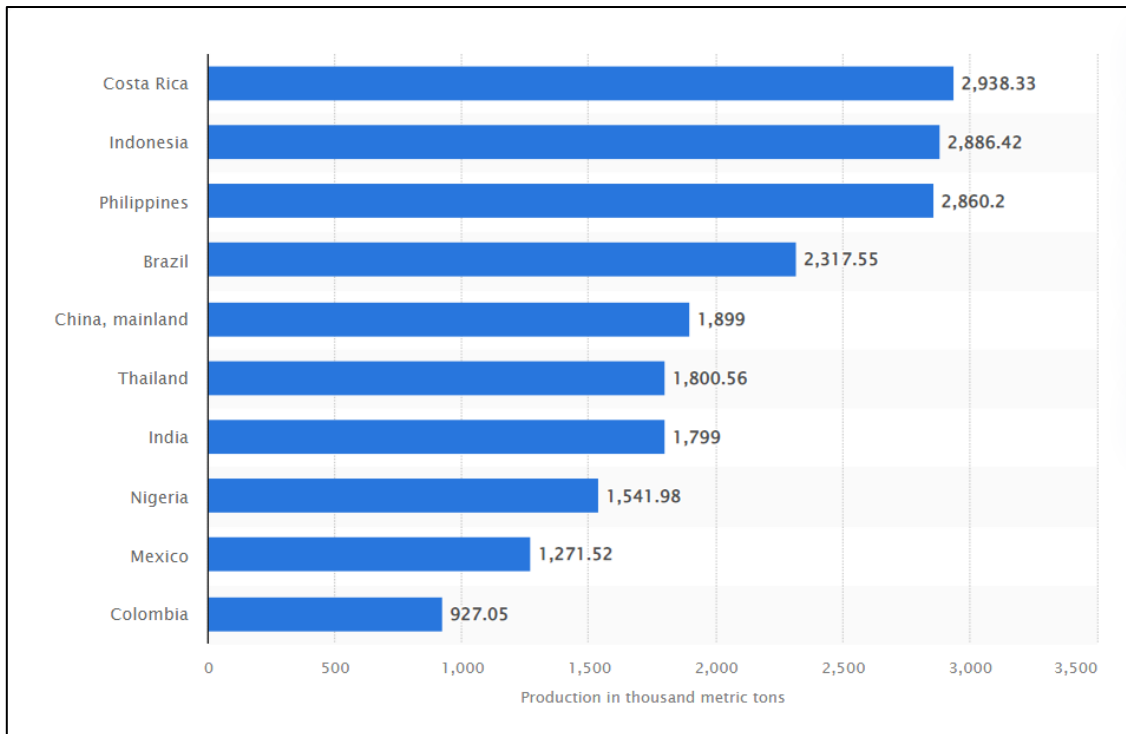


Figure 6 : Principaux pays producteurs d'ananas dans le monde en 2021.
(FAO-Statista, 2023)

En 2021, le Costa Rica, l'Indonésie et les Philippines étaient les trois premiers producteurs d'ananas. La production mondiale s'élevait à 28,65 millions de tonnes, faisant de l'ananas la dixième production fruitière mondiale et le **troisième fruit tropical** le plus produit après la banane et la mangue. Malgré une baisse ponctuelle en 2019 et 2020, la production mondiale a augmenté de 8 millions de tonnes en 10 ans, entraînant une baisse globale des prix. La production pour les marchés d'exportation de l'ananas frais est dominée par le Costa Rica et les Philippines. En 2020, les principaux pays exportateurs vers la France métropolitaine étaient la Côte d'Ivoire avec une part de marché de 37%, le Costa Rica (30%) et la Colombie (18%) (FruiTrop, 2020). Selon son circuit de commercialisation, l'ananas peut être classé en deux groupes, l'ananas 'bateau' et l'ananas 'avion', qui se différencient l'un de l'autre par le stade de récolte des fruits : l'ananas 'avion' est récolté 'mûr à point' et distribué dans les jours suivants sa récolte, alors que l'ananas 'bateau' est récolté 'presque mûr' et maintenu au froid (8°C) jusqu'à sa commercialisation. Des fibres et des produits médicinaux peuvent également être produits (Rohrbach *et al.*, 2003).

1.5.2 Itinéraires techniques et cycle cultural

Les étapes du cycle cultural de l'ananas sont similaires quel que soit le cultivar (**Figure 7**). Avant la plantation, la phase de préparation du sol est capitale car l'ananas possède un système racinaire superficiel qui ne peut croître que dans un milieu meuble, homogène, bien drainé et aéré (Bartholomew *et al.*, 2003). Des billons sont formés à une trentaine de centimètres de hauteur pour favoriser l'aération et le drainage du sol. Le broyage et l'enfouissement des résidus végétaux résultant du précédent cycle cultural sont fortement recommandés pour réduire le risque d'infestation par des ravageurs (symphytes, nématodes, cochenilles) et apporter de la matière organique au sol (Fournier *et al.*, 2011). La culture de l'ananas a surtout besoin d'azote et de potassium pour son développement : l'azote agit sur le volume du plant et le poids du fruit, et le potassium sur la qualité du fruit (Álvarez *et al.*, 1993).



Figure 7 : Représentation des principales étapes de l'itinéraire technique pour la culture de l'ananas à La Réunion. (Barral, 2017)

Les plantations sont réalisées à partir des rejets prélevés sur les plantes d'apparences saines de la précédente culture afin de limiter le développement des maladies et ravageurs. Pour les ananas commercialisés en frais, les couronnes ne pouvant être utilisées (ananas de trop petit calibre), ce sont les cayeux ou les bulbilles qui leur sont préférés. La majorité des producteurs produisent eux-mêmes leurs rejets, et intègrent à leur cycle une phase finale de production de rejets qui inclut un nettoyage par séchage ou par traitement fongicide et une calibration, souvent en trois classes (petit, moyen, gros) allant en pratique de 150 à 400g (Dorey, 2014). Chaque classe de rejet est plantée en ligne sur des billons différents ou des parcelles différentes, entre 8 et 10 cm de profondeur, sur 2 à 4 rangées. La variété et l'objectif économique déterminent la densité de plantation, mais en moyenne 50 à 70 000 pieds par hectare sont plantés à La Réunion (Fournier *et al.*, 2011). La **floraison** est induite naturellement par le climat, lors de la réduction de la photopériode associée à des températures fraîches. Cependant, de nombreux agriculteurs préfèrent induire artificiellement la floraison, cinq à sept mois après la plantation afin de **synchroniser** les périodes de récolte et d'obtenir des parcelles plus homogènes en termes de maturité des fruits (d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997). Le **traitement d'induction florale** ou **TIF** (Soulezelle *et al.*, 2019) est effectué par pulvérisation d'Ethrel®, dont la matière active (éthéphon) se décompose en éthylène, hormone qui déclenche la floraison (Py and Guyot, 1970). Le développement des inflorescences est alors observé sous quatre à huit semaines selon la saison et l'altitude de la parcelle considérée. Cependant, la maturation des fruits n'est jamais totalement homogène. Certains producteurs ont donc recours au déverdissage, qui consiste à appliquer l'éthéphon sur les ananas (Py *et al.*, 1984) pour dégrader la chlorophylle de l'épiderme des fruits et colorer uniformément les ananas, leur donnant un aspect plus attrayant pour le consommateur. Après la récolte des fruits, les plants restent sur la parcelle jusqu'à ce que les rejets atteignent une taille suffisante pour être utilisés pour le cycle suivant (Py *et al.*, 1984).

1.5.3 Particularités de la filière réunionnaise

La Réunion fait partie des producteurs mondiaux de la variété 'Queen Victoria'. La production y est en pleine expansion, entraînant une augmentation des surfaces cultivées de 357 à 488 hectares entre 2010 et 2020, et du nombre d'exploitations

de 335 à 392, dont 31 produisent de l’ananas bio sur un total de 17 ha (**Figure 8**). Selon le dernier recensement agricole de 2020, la production annuelle d’ananas est d’environ **18 000 tonnes**, issue principalement du cultivar ‘*Queen Victoria*’ (DAAF-Réunion, 2021).

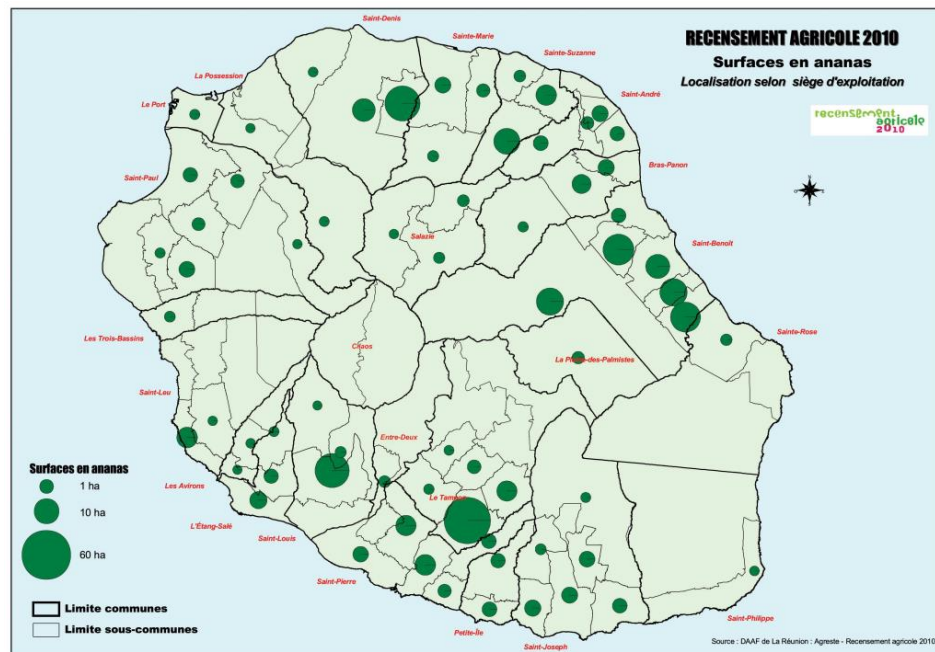


Figure 8 : Surfaces des zones de production d’ananas ‘*Queen Victoria*’ à La Réunion. (Agreste, 2010)

La commercialisation des ananas de La Réunion, se fait encore majoritairement par les circuits courts. L’ananas est le **premier fruit exporté de l’île** (2 189 tonnes en 2021), expédié vers 22 pays à travers le monde, principalement vers la France hexagonale et l’Europe (Agreste, 2021). La production a doublé en dix ans et pourrait encore être multipliée par deux s’agissant du marché du frais, et par trois ou quatre s’agissant des produits transformés, dans les dix ans à venir. Cependant, le rendement et la qualité varient fortement selon les pratiques agricoles locales et les conditions climatiques.

La Réunion est une île volcanique située dans l’Océan Indien, au nord du tropique du Capricorne et à l’Est de Madagascar. Par son relief très accentué, cette île possède un climat très contrasté décliné en une large gamme de températures, de pluviométrie et de rayonnement solaire. Cette hétérogénéité climatique induit des variations de la durée du cycle de production d’ananas, qui peut varier du simple

(11 mois) au double (20 mois), entraînant des pratiques culturelles différentes en fonction des zones de culture (Dorey, 2014).

Les besoins théoriques en eau de l'ananas sont d'environ 80 mm par mois sur sol nu (Carr, 2012). En période sèche et dans certaines zones de l'île, la culture intensive de l'ananas est inenvisageable sans irrigation.

Dans les parcelles réunionnaises, l'ananas est cultivé en monoculture, principalement de manière intensive, la plupart du temps sur paillage polyéthylène. La culture associée de l'ananas avec d'autres plantes en inter-rang est peu fréquente. Les périodes de plantation et de récolte s'étalent sur toute l'année, avec deux pics de production en haute saison, à Pâques et Noël, durant lesquels les exploitants sont assurés d'écouler leurs produits, même si les prix restent en général assez bas du fait d'une production de masse sur l'île. Aussi, l'option de vente à l'export peut se montrer très intéressante en décembre. La stratégie inverse, adoptée par certains producteurs, consiste à produire en hors saison (mai à octobre) dans le but d'obtenir des prix de vente plus élevés sur le marché local (Dorey, 2014).

Afin de maintenir la fertilité des sols et réduire les risques de maladies et de ravageurs, la rotation des cultures est une pratique essentielle en agriculture. A La Réunion, une rotation typique implique la culture de l'ananas pendant 3 à 4 ans, suivie de cultures intercalaires telles que le maïs, le manioc, le taro, le bananier ou encore le potiron, au terme de laquelle, l'ananas peut être replanté pour un nouveau cycle de production.

2 – Principales maladies non virales et bioagresseurs de l'ananas

Chez les végétaux, une maladie est définie comme un état phénotypique anormal qui présente des écarts, appelés 'symptômes', par rapport au phénotype normal attendu (Agrios, 2009). On distingue deux grands types de maladies : **i) Les maladies abiotiques**, dites non-infectieuses, encore nommées **désordres physiologiques**, généralement causées par des facteurs environnementaux d'origine naturelle ou anthropique entraînant une altération du phénotype normal attendu. On peut citer par exemple, les **carences** en certains nutriments, les

accidents climatiques (sécheresse, insolation excessive, gel, excès d'eau entraînant une anoxie racinaire, etc), les agressions chimiques (ozone, sel, produits phytosanitaires, etc.), les anomalies génétiques ; **ii) les maladies biotiques ou infectieuses**, causées par des **bioagresseurs** tels que des champignons, bactéries et/ou virus, favorisées par certaines conditions environnementales (problèmes hydriques, changement climatique,...), ou des ravageurs (insectes, ...). Les cultures d'ananas sont affectées à la fois par des maladies non infectieuses (stress hydrique, carences nutritives ...), et infectieuses associées à différents bioagresseurs (agents phytopathogènes, ravageurs).

2.1 Les maladies abiotiques

Chez l'ananas, certains désordres physiologiques peuvent entraîner l'apparition de symptômes dont la diversité et l'hétérogénéité semblent dépendre de facteurs climatiques (Singh and Sastry, 1974). Par exemple, une **sécheresse** importante ou au contraire un **excès d'eau** peuvent entraîner un arrêt de la croissance, l'apparition progressive de jaunissement puis de **rougissement** et d'un enroulement de la feuille. Une **luminosité** trop importante amène aussi à des variations de couleur des feuilles (Py *et al.*, 1984). Les **carences minérales** sont également associées à des symptômes de **jaunissement** (carence en azote et en soufre), de **dessèchement** des extrémités foliaires (carence en phosphore et potassium), et de jaunissement et de dessèchement des feuilles âgées (carences en magnésium) (Py *et al.*, 1984). La chlorose ferrique par excès de manganèse dans le sol est fréquente à La Réunion et provoque un jaunissement des feuilles et une diminution de rendement.

2.2 Les bioagresseurs

Les **bioagresseurs** sont des organismes vivants qui attaquent les plantes cultivées et sont susceptibles de causer des pertes économiques. Ils se répartissent en trois grandes familles (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bioagresseur>) : **les ravageurs animaux** (prédateurs ou parasites des plantes), **les agents phytopathogènes** (champignons, bactéries, virus principalement), qui causent des maladies chez les plantes, et les **adventices**, qui concurrencent les plantes

cultivées, favorisent la pullulation de ravageurs et de vecteurs de maladies, dont elles peuvent également être des réservoirs (Py *et al.*, 1984).

2.2.1 Symphyles

Les symphyles sont de petits myriapodes polyphages, parasites du sol, qui mesurent 1 à 2 mm et sont visibles à l'œil nu (**Figure 9 A**). Certains d'entre eux, comme *Hanseniella* sp., *Symphylella tenella* ou *Scutigereella sikimurai*, sont responsables des principaux dégâts racinaires de l'ananas (Lobo and Yahia, 2017). Ils se nourrissent du méristème et attaquent l'extrémité des racines, au niveau des poils absorbants, affaiblissant l'ancrage des plants (**Figure 9 B**). Lors de la consommation des racines, ils créent également des plaies propices à l'entrée d'autres bioagresseurs.

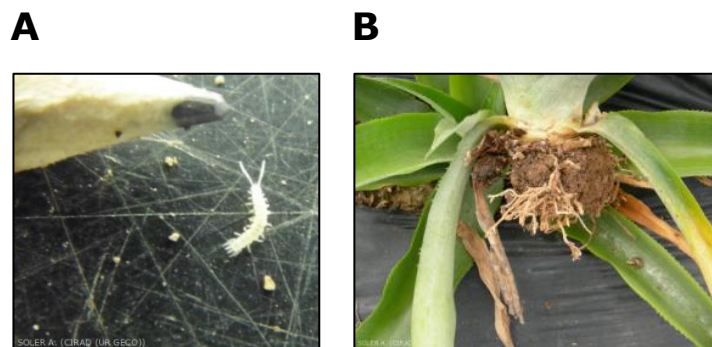


Figure 9 : Photographies : (A) d'un symphyle visible à l'œil nu, et (B) de racines détruites par des nématodes et des symphyles. (Source ephytia)

Les symptômes sont visibles sur l'appareil racinaire qui reste peu développé et prend l'aspect de 'balai de sorcière', et sur les feuilles qui développent des colorations rouges et une forme plus étroite. L'absorption des éléments nutritifs étant entravée, la croissance de la plante et son développement sont donc freinés. Même si les fruits restent commercialisables, les rendements sont parfois réduits de plus de 50%. Les symphyles de l'espèce *Hanseniella* peuvent survivre jusqu'à quatre mois sans aliment dans un sol humide et aéré, et plusieurs années dans des sols contenant des matières organiques. Ils sont présents à La Réunion (Cabi, 2021).

2.2.2 Nématodes

Trois espèces de nématodes affectent de manière significative la production d'ananas dans le monde (Ploetz, 1994), et sont présentes à La Réunion (Keetch and Buckley, 1984; Lamberti *et al.*, 1986) : *Meloidogyne javanica* (**Figure 10 A**), *Rotylenchulus reniformis* (**Figure 10 B**), *Pratylenchus brachyurus* (**Figure 10 C**).



Figure 10 : Photographies de : (A) un mâle de *Meloidogyne* sp, et (B) *Rotylenchulus reniformis*, vus au microscope (x 400), (C) *Pratylenchus brachyurus* (x 1600). (ephytia)

Les dommages causés par les nématodes aux systèmes racinaires de l'ananas (formation de galles et destruction des racines secondaires), entraînent un ralentissement de la croissance, et la formation de feuilles étroites et érigées, de coloration jaune, rosée à rouge, voire un dessèchement et un flétrissement des plantes. Certains cultivars d'ananas montrent une certaine tolérance aux nématodes (Rohrbach and Johnson, 2003).

2.2.3 Acariens

Des acariens tels que *Dolichotetranychus floridanus* Banks, ou araignées rouges (**Figure 11 A**), forment des colonies à la base des feuilles, des tiges, et de la couronne de la plante (Beard *et al.*, 2012). Ils causent peu de dégâts sur les fruits, mais ils attaquent surtout les jeunes plants qu'ils rendent plus sensibles aux agressions d'autres bioagresseurs (bactéries, champignons...). Leur présence est souvent corrélée à de fortes températures. Ils se nourrissent à la base des feuilles, des bractées et des sépales de la fleur, et parfois au niveau de la couronne du fruit. Ils peuvent se développer sur des feuilles détachées du plant, ou dans le sol sous les plants infestés (Beard *et al.*, 2012).

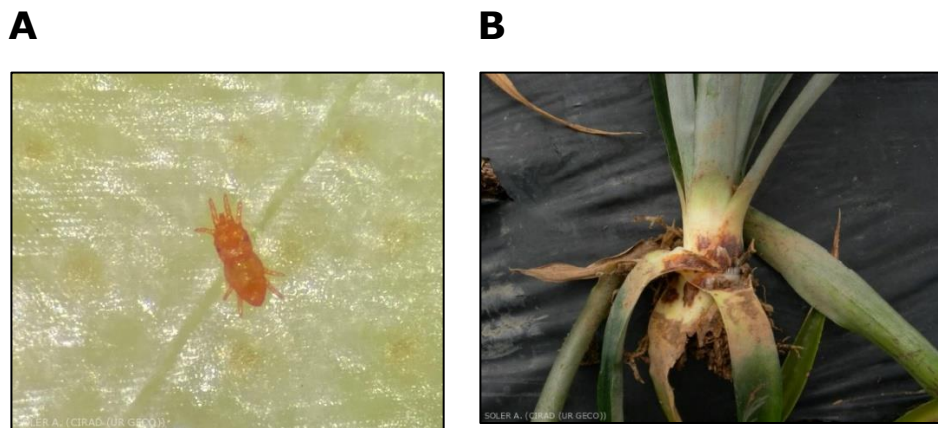


Figure 11 : Photographies de : (A) *Dolichotetranychus floridanus* vu à la loupe binoculaire, et (B) traces rouges à la base des feuilles formées par des colonies d'acariens. (Source ephytia)

Ils provoquent des nécroses rouges sur la base des feuilles (**Figure 11 B**) et une baisse du calibre du fruit. Ces acariens sont présents à La Réunion (CIRAD-IRFA, 1987).

2.2.4 Insectes

Chenille foreuse de l'ananas

Strymon megarus est un petit papillon qui mesure en moyenne 28 mm (**Figure 12 A**). Il est originaire du continent américain et n'a à ce jour pas été décrit à La Réunion, mais uniquement recensé en Guyane (Py *et al.*, 1987). Il attaque tous les cultivars d'ananas chez lesquels sa chenille grignote la chair du fruit, ronge son pédoncule et provoque une gommose (**Figure 12 B et C**).

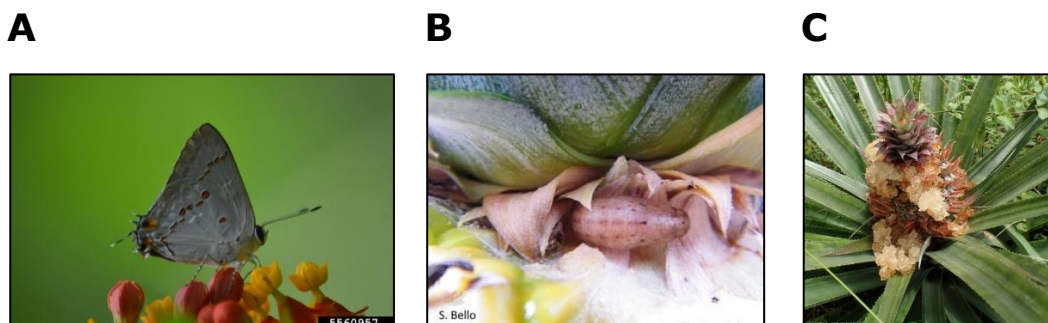


Figure 12 : Photographies de : (A) du papillon *Strymon sp.*, (B) de la chenille sur la face inférieure d'une feuille d'ananas, et (C) de la chenille foreuse de l'ananas provoquant une gommose. (Source ephytia)

Cochenille diaspine de l'ananas

Diaspis bromeliae se trouve le plus souvent sous les feuilles de l'ananas (Joy and Anjana, 2015). Elle est visible à l'œil nu et mesure quelques millimètres (**Figure 13**). Comme toutes les diaspines, *D. bromeliae* est un insecte piqueur-suceur qui se nourrit de la sève élaborée. Sa présence entraîne des taches jaunâtres et grisâtres sur les feuilles et un dessèchement de la plante (Joy and Anjana, 2015). Elle est présente à La Réunion (Mekdoud and Jeuffrault, 1999).



Figure 13 : Cochenille diaspine de l'ananas. (Source ephytia)

Cochenille farineuse de l'ananas

Les cochenilles de l'espèce *Dysmicoccus* sont des insectes piqueurs-suceurs qui se nourrissent de la sève élaborée de leurs plantes hôtes et sont décrits comme vecteurs de phytovirus (García Morales *et al.*, 2016). *Dysmicoccus brevipes* ou 'pink pineapple mealybug' (**Figure 14 A et C**), est répandue dans les principales zones de production d'ananas. Elle est soupçonnée par certains auteurs de contribuer aux symptômes de dépérissement associés à la maladie du wilt. Une deuxième espèce, *Dysmicoccus neobrevipes*, ou 'grey pineapple mealybug' (**Figure 14 B**), est décrite dans la littérature comme vectrice d'ampelovirus associés à cette maladie (Gunasinghe and German, 1989; Sether *et al.*, 1998). Ces deux espèces sont présentes sur ananas à La Réunion (Ben-Dov, 1994). Les cochenilles peuvent être présentes tout au long du cycle de la culture (de la plantation à la récolte). Certaines fourmis (des espèces *Pheidole* et *Solenopsis*) ont une relation mutualiste avec les cochenilles (**Figure 14 C**). En contrepartie de leur protection, les fourmis collectent le miellat produit par les cochenilles. Le rôle des cochenilles et des fourmis dans l'étiologie de la maladie du wilt sont largement développés dans les parties 5.4.2 et 5.4.3.



Figure 14 : Cochenilles farineuses (A) *Dysmicoccus brevipes*, (B) *Dysmicoccus neobrevipes*, et (C) Association mutualiste entre les fourmis et les cochenilles.
(Source D. Massé (A et B) ; Dey et al., 2018 (C))

2.2.5 Champignons

Ceratocystis paradoxa

Ceratocystis paradoxa est un champignon dont la forme asexuée se nomme *Chalara paradoxa* (Mahady et al., 2002). Il est capable de pénétrer la plante à travers des blessures non cicatrisées. Ce champignon opportuniste, présent à La Réunion (Compendium, 2021), cause trois maladies distinctes (**Figure 15**).

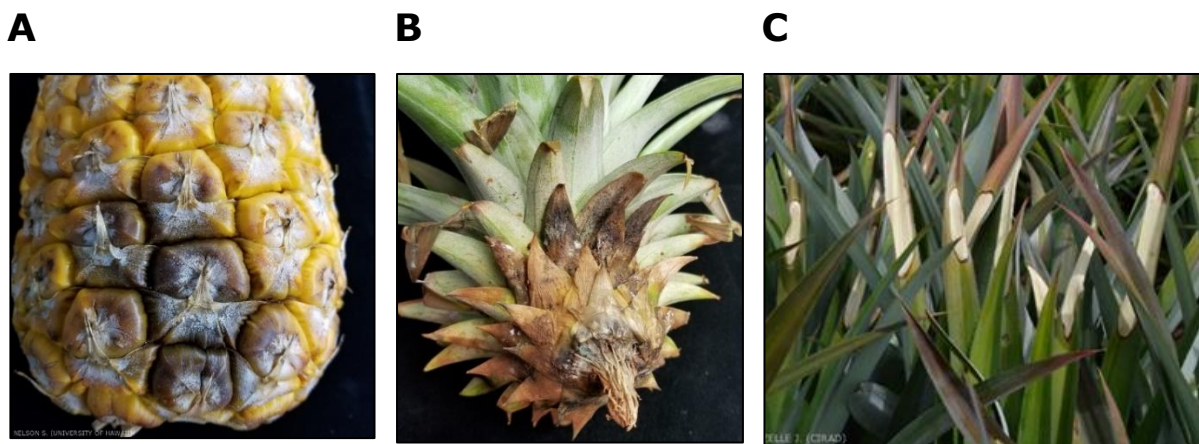


Figure 15 : Les maladies causées par *Ceratocystis paradoxa* : (A) le 'Black rot', (B) le 'Butt rot', et (C) le 'White leaf spot'. (Source ephytia)

1) Le 'Black rot' : qui affecte le fruit (**Figure 15 A**).

C'est une maladie post-récolte qui se développe sur la peau du fruit lors du stockage au froid du fruit, à la faveur d'une rupture de la chaîne du froid (De Souza et al., 2015). Son incidence dépend du climat lors de la récolte, du nombre de chocs qu'a subi le fruit, ainsi que de la quantité de *C. paradoxa* présente. Les

symptômes apparaissent généralement deux à trois jours après la récolte et se caractérisent par une pourriture noire pouvant gagner l'ensemble du fruit, finissant par dessécher l'ensemble du plant (De Souza *et al.*, 2015).

2) Le '*Butt rot*' : qui touche la base des feuilles et du fruit (**Figure 15 B**).

Cette maladie peut se propager lors de l'empilement des rejets et des fruits (Sanewski *et al.*, 2018) et contaminer la totalité de la pile. Le développement de la zone infectée se fait plus rapidement lors de périodes humides, qui favorisent la propagation des spores. Les symptômes sont des pourritures à la base des feuilles et du fruit, et un ralentissement de croissance des plants moyennement infestés (Sanewski *et al.*, 2018).

3) Le '*White leaf spot*' : qui affecte les feuilles (**Figure 15 C**).

Cette maladie n'affecte que l'aspect des feuilles et cause très peu de pertes (Sanewski *et al.*, 2018). Cependant il existe, lors de la récolte, un risque de contamination du fruit qui causerait la maladie du '*Black rot*'. Les symptômes commencent par une petite tache brune sur les feuilles au niveau de zones d'abrasion puis s'étendent vers l'extrémité de la feuille. Par temps sec, la tache devient blanche en son centre, avec parfois un contour marron (Sanewski *et al.*, 2018).

Champignons des genres *Pythium* et *Phytophthora*

Les '*Heart and root rots*' sont des maladies causées par plusieurs espèces d'oomycètes des genres *Pythium* et *Phytophthora* (Green and Nelson, 2015). Les espèces de *Phytophthora* pathogènes pour l'ananas sont *P. nicotianae*, *P. cinnamomi* et *P. palmivora*. *P. nicotianae* infecte plutôt les parties aériennes du plant. *P. cinnamomi* pénètre par les racines (maladie du '*root rot*' qui peut aussi être due aux *Pythium spp.*) et provoque leur pourriture. Très contagieux, car il est disséminé par l'eau et les outils contaminés, il est présent dans la plupart des zones de production d'ananas (Green and Nelson, 2015), y compris la Réunion (Cabi, 2021). *P. nicotianae* et *P. cinnamomi* causent une pourriture du cœur du plant auquel le cultivar 'MD-2' est très sensible. *P. palmivora* pénètre dans les tissus de l'ananas principalement par des blessures et provoque à la fois des pourritures sur fruits et racines (Boher, 1974).



Figure 16 : Plants d'ananas infectés par *Phytophthora sp.* (Source ephytia)

Les plantes affectées par la pourriture des racines due aux *Phytophthora* apparaissent flétries, les feuilles prennent une couleur jaune clair, teintée de rose ou de marron (**Figure 16**).

Champignons du genre *Fusarium*

Les fusarioses sont des maladies causées par les champignons du genre *Fusarium*, comme par exemple *Fusarium guttiforme* qui est responsable de la fusariose de l'ananas. Cette maladie peut se développer lors de la culture mais aussi post-récolte (Ploetz, 1994). Bien qu'elle soit peu répandue, elle provoque de lourds dégâts dans les zones dans lesquelles elle est présente, comme la Martinique.

La maladie provoque des symptômes foliaires (feuilles courbées, plus petites, et perturbées dans leur arrangement), et des exsudations de gomme sur fruit (**Figure 17 A**).

A



B



Figure 17 : Symptômes de (A) fusariose, et de (B) tache noire sur ananas. (Source ephytia)

La maladie de la tache noire, aussi appelée 'Fruitlet core rot', est très répandue dans les zones tropicales dont La Réunion (Barral, 2017). Elle est causée par un

complexe de champignons *Fusarium spp.* et *Talaromyces stollii* et provoque, après récolte, l'apparition de taches brunes dans la chair des fruits (**Figure 17 B**). Il n'existe aucune technique de détection fiable. Le cultivar 'MD-2' est résistant à cette maladie à l'inverse du cultivar 'Queen Victoria' qui y est très sensible. Les fruits récoltés durant l'hiver sont plus susceptibles de présenter des symptômes (Barral *et al.*, 2020; Zakaria, 2023).

2.2.6 Bactéries

Dickeya zae

Dickeya zae est une bactérie responsable de deux maladies sur ananas, la pourriture du cœur ou 'heart rot' (**Figure 18 A**) et le 'Fruit collapse' (**Figure 18 B**) (Ploetz, 1994). Les symptômes de ces maladies apparaissent généralement deux à trois semaines avant la maturité des fruits. Les jeunes feuilles sont gorgées d'eau et présentent des stries brunes, le cœur du plant pourrit en provoquant une odeur de fermentation, puis un flétrissement généralisé apparaît quelques jours avant la mort de la plante (Cano-Reinoso *et al.*, 2021). Ce champignon est présent à La Réunion.

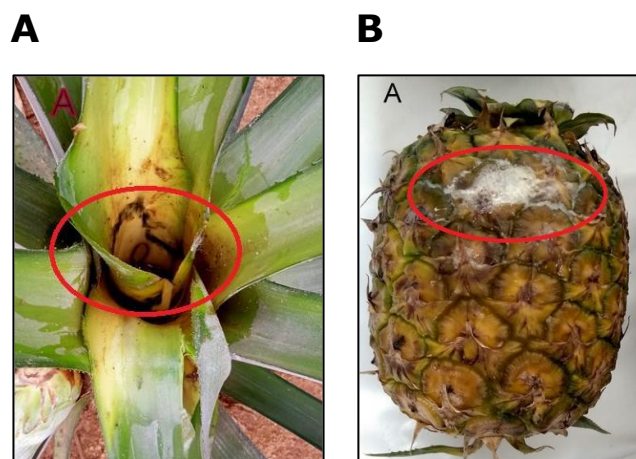


Figure 18 : Symptômes de la pourriture bactérienne du cœur, ou 'heart rot' avec (A) les jeunes feuilles imbibées d'eau et les stries brunes sur la partie basale blanche (cercle rouge). Symptômes de la maladie du 'fruit collapse' après la récolte avec (B) un dégagement de gaz sous forme de bulles (cercle rouge). (Cano-Reinoso *et al.*, 2021)

Gluconobacter oxydans, Pantoea citrea et Acetobacter aceti

La 'Pink disease' est provoquée par les bactéries *Gluconobacter oxydans*, *Pantoea citrea* ou *Acetobacter aceti* (Green and Nelson, 2015). Les fruits infectés ne

présentent pas de symptômes externes, même lorsqu'ils sont mûrs. A l'intérieur, la chair peut être imbibée d'eau, d'une couleur rose pâle, et dégageant une odeur aromatique (**Figure 19**). La bactérie infecte la fleur ouverte par temps frais. On pense que les bactéries sont transportées par des insectes et des acariens se nourrissant du nectar des fruits infectés et en décomposition à proximité des champs de floraison (Green and Nelson, 2015; Joy and Sindhu, 2012).

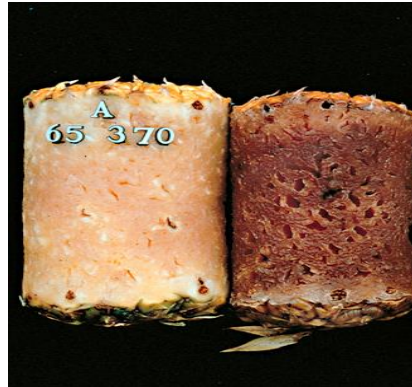


Figure 19 : Cylindre d'ananas infectés par *Gluconobacter oxydans*, (A) frais et (B) cuit. (Rohrbach, 2003)

Pantoea ananatis* et *Acetobacter peroxydan

La marbrure de l'ananas ou 'Marbling', est causée par les bactéries *Pantoea ananatis* et *Acetobacter peroxydan* (Joy and Sindhu, 2012). La maladie apparaît lorsque les fleurs sont initiées et que les fruits mûrissent dans des conditions chaudes et humides. Les bactéries pénètrent par la fleur ouverte et les fissures de croissance naturelles à la surface du fruit. Les fruits infectés ne présentent aucun symptôme extérieur, mais à l'intérieur, la chair est rouge-brun et granuleuse, elle a une consistance ligneuse (**Figure 20**) et généralement une faible teneur en acide et en sucre (Joy and Sindhu, 2012).

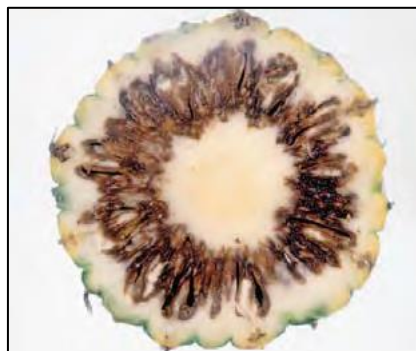


Figure 20 : Symptômes typique sur fruit du 'Marbling'. (Source ephytia)

3 – Les virus décrits sur ananas

Les virus décrits sur ananas appartiennent aux genres ***Ampelovirus*** (famille *Closteroviridae*), ***Badnavirus*** (famille *Caulimoviridae*), ***Orthotospovirus*** (famille *Tospoviridae*) et ***Sadwavirus*** (famille *Secoviridae*) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des virus connus chez l’ananas.

Taxonomie	Virus	pineapple mealybug wilt-associated viruses	pineapple bacilliform viruses	pineapple secovirus	tomato spotted wilt virus
	Acronyme	PMWaV1, 2, 3, 5, 6	PBCOV, PBERV	PSV	TSWV
	Famille	<i>Closteroviridae</i>	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Tospoviridae</i>
	Genre (sous genre)	<i>Ampelovirus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Sadwavirus (Cholivirus)</i>	<i>Orthotospovirus</i>
	Critère de démarcation	75% d'identité dans la séquence protéique de la protéine de capsid (CP), l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et la protéine de choc thermique homologue (HSP70h)	80% d'identité nucléique dans la séquence de l'ORF3 codant la polymérase (domaines reverse transcriptase (RT) et ribonucléase H (Rnase H))	80% d'identité dans la séquence protéique du domaine Pro-Pol	80% d'identité dans la séquence protéique de la nucléoprotéine (N-protéine)
Références	Fuchs et al., 2020	Teycheney et al., 2020	Fuchs et al., 2022 ; Sanfaçon et al., 2020	Abudurexit et al., 2019	

Particule virale		flexueuse et filamenteuse	bacilliforme non enveloppée	icosaédrique non enveloppée	sphérique et enveloppée
Génome	Type	linéaire à ARN simple brin positif	circulaire à ADN double brin encapsidé	linéaire bipartite à ARN simple brin positif	linéaire tripartite à ARN simple brin négatif
	Taille	13 à 17,4 kb	7,5 à 7,9 kbp	5,9 kb (RNA1) and 3,8 kb (RNA2)	2,9 à 8,9 kb
Références		Dolja et al., 2006 ; Martelli et al., 2005	Hull et al., 2000 ; Geering et Hull, 2012 ; Vanitharani et al., 2005	Lin and Johnson, 2003 ; Thompson, 2020	Haan et al., 1990

3.1 Ampelovirus

Trois ampelovirus infectant l’ananas sont reconnus par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) : **pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV1)**, **PMWaV2** et **PMWaV3** (Fuchs *et al.*, 2020). Un autre ampélovirus, **PMWaV6**, n’est pas encore reconnu (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b; Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005a; Sether *et al.*,

2005b). Enfin, des données de séquence très partielles ont suggéré l'existence d'un pineapple mealybug wilt-associated virus 5 (PMWaV5) (Gambley *et al.*, 2008b). Le PMWaV4, initialement décrit comme une nouvelle espèce, est une souche du PMWaV1 (Dey *et al.*, 2018; Green *et al.*, 2020).

L'organisation du génome des PMWaV déduite des séquences génomiques complètes disponibles est identique à celle des autres ampelovirus (**Figure 21**). Leur partie 5' comporte un bloc de gènes codant des protéines impliquées dans la réplication virale, et portant des domaines conservés protéase (L-Pro), hélicase (Hel), méthyltransférase (Mtr) et ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b; Melzer *et al.*, 2001; Melzer *et al.*, 2008; Sether *et al.*, 2009). Leur partie 3' comporte pour sa part des gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure et le mouvement des particules virales, et la suppression de l'extinction des gènes (Dey *et al.*, 2015; Melzer *et al.*, 2001; Melzer *et al.*, 2008; Sether *et al.*, 2009).

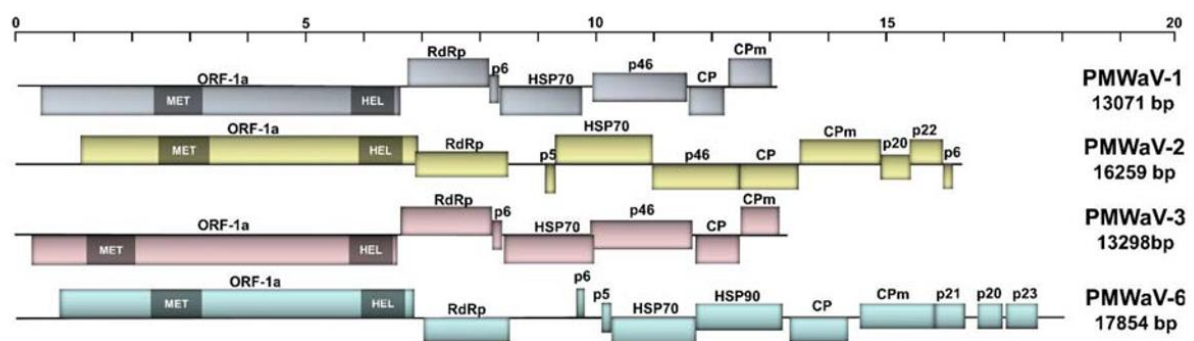


Figure 21 : Organisation génomique des ampelovirus infectant l'ananas dont le génome a été entièrement séquencé. (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b).

MET : méthyltransférase ; HEL : hélicase ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante ; HSP : protéine heat shock ; CP : protéine capsidique ; CPm : protéine mineure capsidique mineure.

Les génomes de PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 et PMWaV6 comportent sept à onze ORF (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b; Melzer *et al.*, 2001; Melzer *et al.*, 2008; Sether *et al.*, 2009). Le genre *Ampelovirus* est divisé en deux sous-groupes sur la base des relations phylogéniques (**Figure 22**) et de l'organisation du génome viral. PMWaV2 et PMWaV6 appartiennent au sous-groupe I, tandis que PMWaV1, PMWaV3 et PMWaV5 appartiennent au sous-groupe II (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b; Martelli *et al.*, 2002; Martelli *et al.*, 2012).

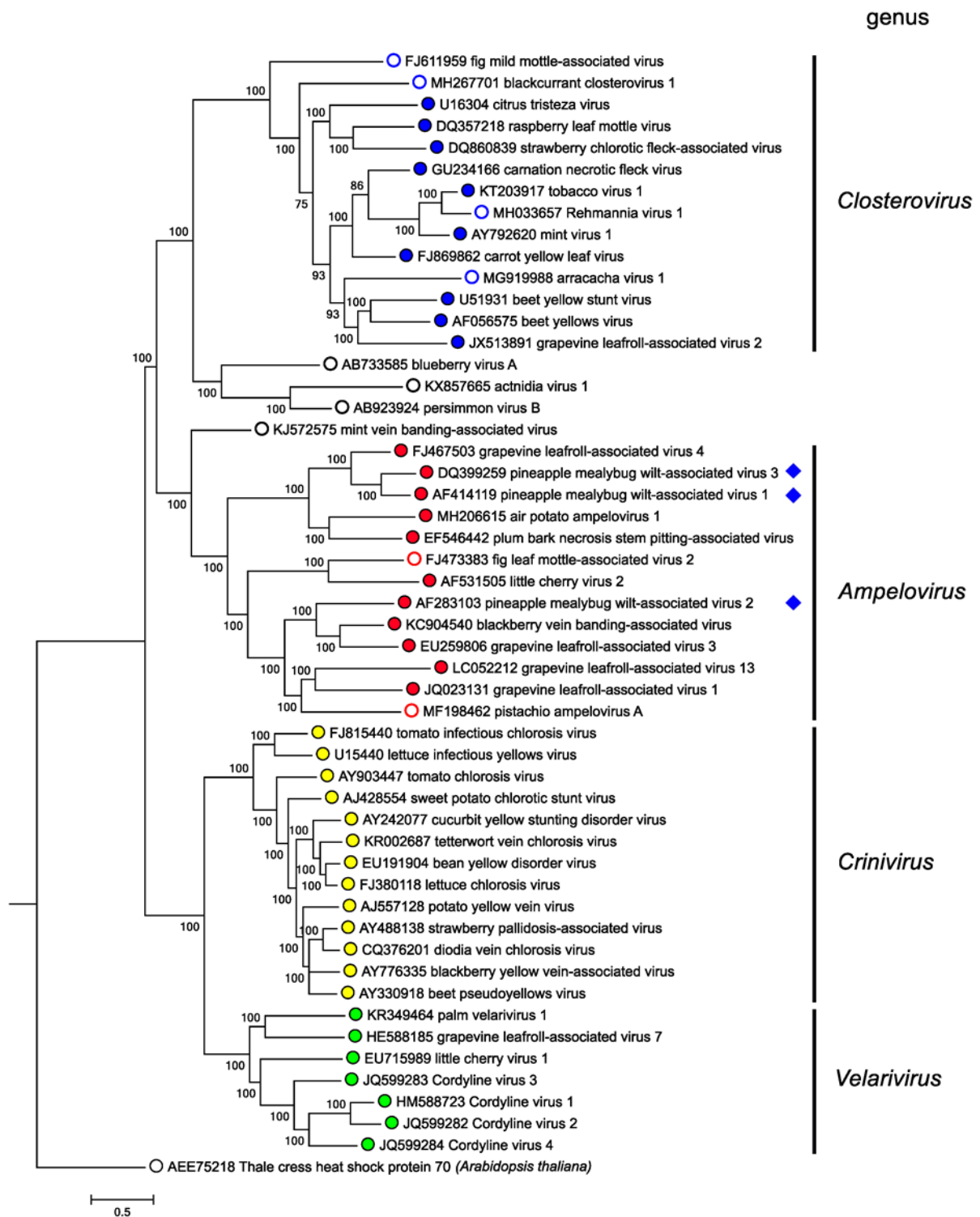


Figure 22 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les virus et les genres viraux de la famille *Closteroviridae* sur la base de comparaisons de la séquence de la protéine HSP70h. Les points de couleur indiquent les genres viraux, les cercles vides indiquant les virus non reconnus par l'ICTV, et les membres des espèces d'*Ampelovirus* caractérisées sur ananas en losange bleu. (Martelli et al., 2012 modifié)

Les ampélovirus sont transmis selon un mode semi-persistant par des insectes vecteurs, principalement des **cochenilles** (Martelli *et al.*, 2002). Deux d'entre elles, *D. brevipes* et *D. neobrevipes*, sont connues pour transmettre les PMWaV1, 2 et 3 (Sether and Hu, 2002a; Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005a; Sether *et al.*, 1998). Bien que tous les stades de *D. neobrevipes* semblent avoir la capacité d'acquérir les PMWaV, l'efficacité de la transmission diminue significativement chez les femelles adultes (Sether *et al.*, 1998; Subere *et al.*, 2011b). Aucune étude à ce jour n'a démontré formellement la capacité des cochenilles à transmettre le PMWaV6.

Les **symptômes associés** aux PMWaV évoquent souvent des **déficiences nutritionnelles** et rendent le diagnostic visuel difficile. Ils incluent une décoloration des feuilles, l'enroulement vers le bas du bord des feuilles, la réduction de la croissance des plantes et le flétrissement (Carter, 1945a).

Le seul hôte connu des PMWaV est *Ananas comosus* (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2021; Sether *et al.*, 2001), mais certaines données suggèrent que des graminées comme *Andropogon insularis* et *Paspalum urville* pourraient servir d'hôtes intermédiaires (Gunasinghe and German, 1989). A Cuba, *Bromelia pinguin*, ananas sauvage du genre *Bromelia* (famille *Bromeliaceae*), couramment utilisé pour construire des clôtures vivantes, est un hôte du PMWaV2 et pourrait jouer un rôle dans l'épidémiologie de la maladie du wilt, à laquelle sont associés les PMWaV (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014).

3.2 Badnavirus

Deux badnavirus infectant l'ananas ont été identifiés : **pineapple bacilliform CO virus (PBCOV, *Badnavirus alphananas*)** (Sether *et al.*, 2012) et **pineapple bacilliform ER virus (PBERV, *Badnavirus betananas*)** (Gambley *et al.*, 2008a). A Hawaï (Sether *et al.*, 2012) et en Australie (Gambley, 2008; Gambley *et al.*, 2008a), une séquence de *Caulimoviridae* de nature probablement endogène, non encapsidée, a également été identifiée dans le génome d'*A. comosus*. Elle a été nommée endogenous pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1). Les analyses phylogéniques ont montré qu'elle appartenait à un taxon différent des badnavirus avec seulement 48% d'identité nucléotidique avec le PBERV ou le PBCOV (Gambley *et al.*, 2008a). Il a été proposé que les séquences ePPRV-1 sont des vestiges de

virus ancestraux qui se sont intégrés dans le génome d'*Ananas comosus* par transfert horizontal de gène (Sether *et al.*, 2012). Il n'y a pas de preuve à ce jour que les ePPRV présents dans le génome d'ananas soient capables de répliation et pourraient produire des particules virales infectieuses. Enfin un rétrotransposon, l'*Ananas metavirus* (AMtV), a également été décrit (Gambley *et al.*, 2008a; Sether *et al.*, 2012).

La taille et l'organisation du génome du PBCOV et du PBERV sont similaires à celles des autres badnavirus. Ces génomes portent 3 cadres ouverts de lecture (ORF ; **Figure 23**). Les ORF1 et 2 codent pour des protéines de fonction inconnue. L'ORF3 code pour une polyprotéine portant les domaines conservés d'une protéase, d'une reverse transcriptase, d'une ribonucléase H1 et de la protéine de capsid (Geering, 2021; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b).

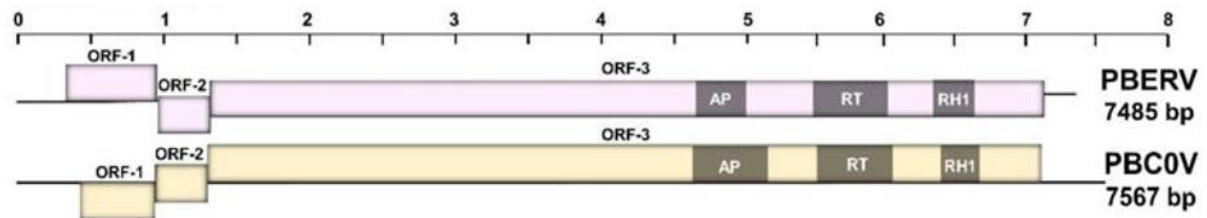


Figure 23 : Organisation du génome des badnavirus infectant l'ananas : pineapple bacilliform CO virus (PBCOV), et pineapple bacilliform ER virus (PBERV). AP, *retropepsin* (*pepsin-like aspartic protease*); RT, *reverse transcriptase*; RH1, *Ribonucléase H*. (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b)

Une analyse phylogénétique utilisant le domaine conservé RT/RNase H de la polymérase a montré que le PBCOV et le PBERV sont des virus proches et qu'ils forment un clade distinct des autres badnavirus (**Figure 24**) (Gambley *et al.*, 2008a).

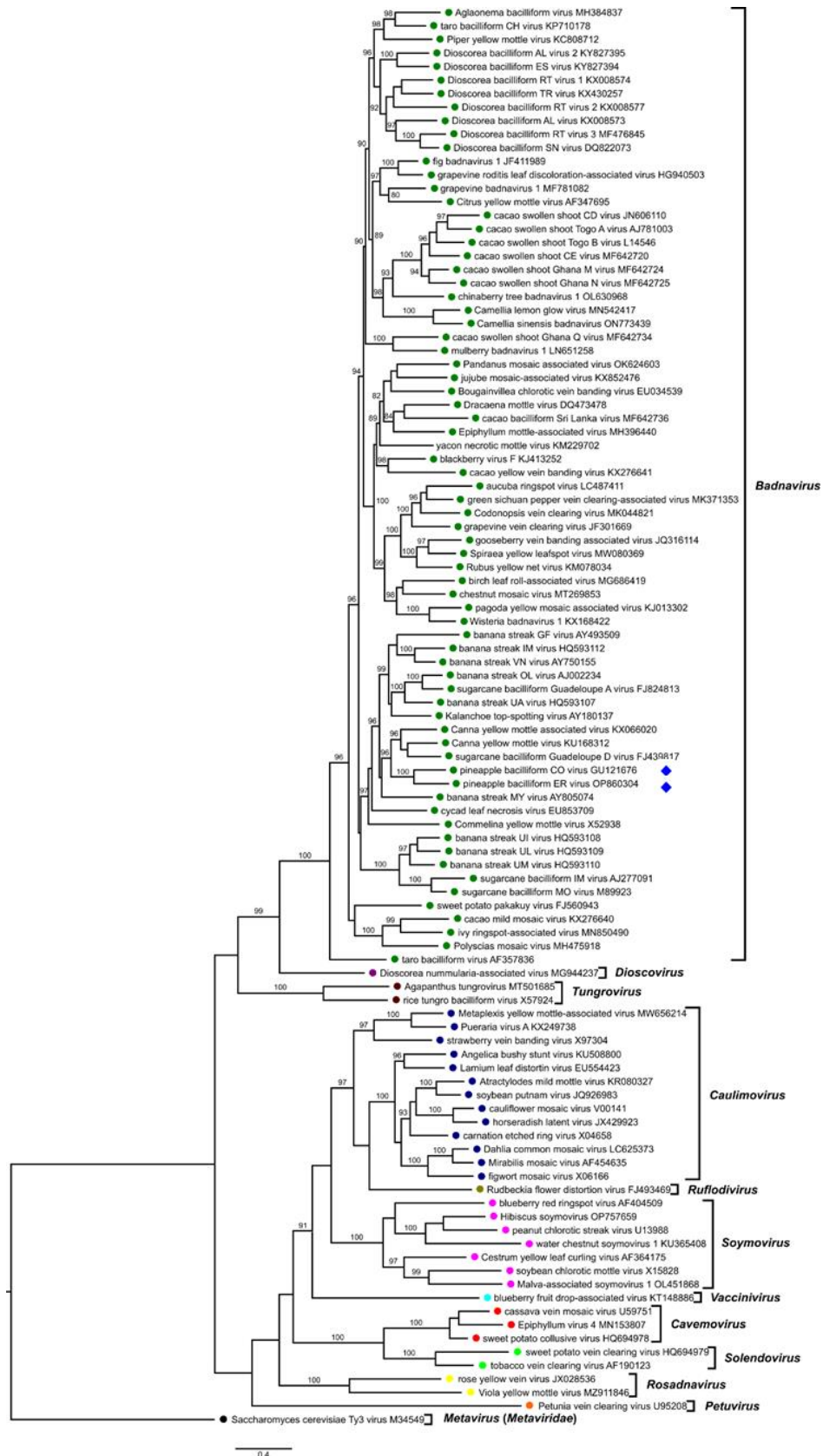


Figure 24 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences de virus des différents genres de la famille *Caulimoviridae*, et réalisé sur la partie codante des séquences du gène de la polymérase d'isolats de virus exemplaires de chaque espèce virale, correspondant aux positions nucléotidiques 3741-5654 dans le génome du virus de la mosaïque du chou-fleur (V00141). Les deux badnavirus d'ananas reconnus par l'ICTV sont indiqués par un losange bleu. (Marie Ueber, INRAE)

Des essais de transmission expérimentale sur ananas ont montré que le PBCOV et le PBERV sont transmissibles selon le mode semi-persistant par la cochenille **D. brevipipes** et que le PBCOV est transmis par **P. citri** et **D. neobrevipes** (Gambley *et al.*, 2008a; Sether *et al.*, 2012). Aucun symptôme n'a été observé sur les plantes infectées par ces virus (Gambley *et al.*, 2008a). En général, l'infection par les badnavirus est associée à des **symptômes de chlorose** et de **décoloration** des tissus foliaires mais dans certaines infections, les symptômes sont transitoires ou absents (Bouhida *et al.*, 1993; Daniells *et al.*, 2001; Geering and Thomas, 2002; Lockhart and Olszewski, 1996).

Les hôtes connus de ces deux badnavirus appartiennent à la famille des Broméliacées, avec notamment le genre *Ananas*, mais aussi quatre autres genres (*Aechmea*, *Billbergia*, *Cryptanthus*, *Neorgelia*), qui ont été identifiés au Sri Lanka (Kularatne *et al.*, 2017).

3.3 Sadwavirus

Récemment, trois sadwavirus infectant l'ananas ont été identifiés à Hawaï, dont deux espèces reconnues par l'ICTV, **pineapple secovirus A (PSVA, *Sadwavirus alphananas*)** et **pineapple secovirus B (PSVB, *Sadwavirus betananas*)** et une troisième qui ne l'est pas encore, **pineapple secovirus C (PSVC)** (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022a; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b). Deux autres sadwavirus, ont également été identifiés *in silico* par analyses de transcriptomes d'ananas collectés en Chine, et ont été nommé **pineapple secovirus D (PSVD)** (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b), et **Ananas comosus secovirus (AcSV, *Sadwavirus gammananas*)** (Sidharthan *et al.*, 2022).

Le génome des sadwavirus d'ananas comportent deux ARN codant chacun pour une seule polyprotéine (**Figure 25**) (Sanfaçon *et al.*, 2020). La polyprotéine codée par l'ARN1 comporte cinq domaines conservés associés à la réplication, tandis que la polyprotéine codée par l'ARN2 comporte des domaines conservés d'une protéine de mouvement et d'une protéine de capsid.

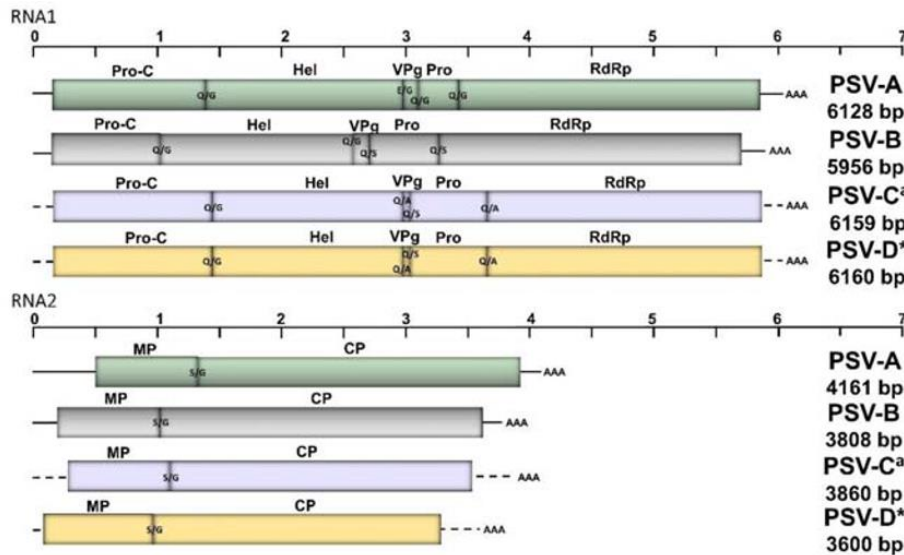


Figure 25 : Organisation du génome des pineapple secovirus A (PSVA), PSVB, PSVC, et PSVD. Pro-C : protease factor ; Hel : helicase ; VPg : viral-linked protein ; Pro : protease ; RdRp : RNA-dépendant RNA polymérase ; MP : movement protéin ; CP : coat protéin. Les lignes verticales sur les ORF représentent les sites putatifs de clivage, et les lignes en pointillés les séquences incomplètes aux extrémités 5' et 3'. (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b)

Une analyse phylogénétique utilisant la région protéique Pro-Pol a montré que les PSVA et PSVB appartiennent au sous-genre *Cholivirus* du genre *Sadwavirus* (**Figure 26**) (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b; Sanfaçon *et al.*, 2020).

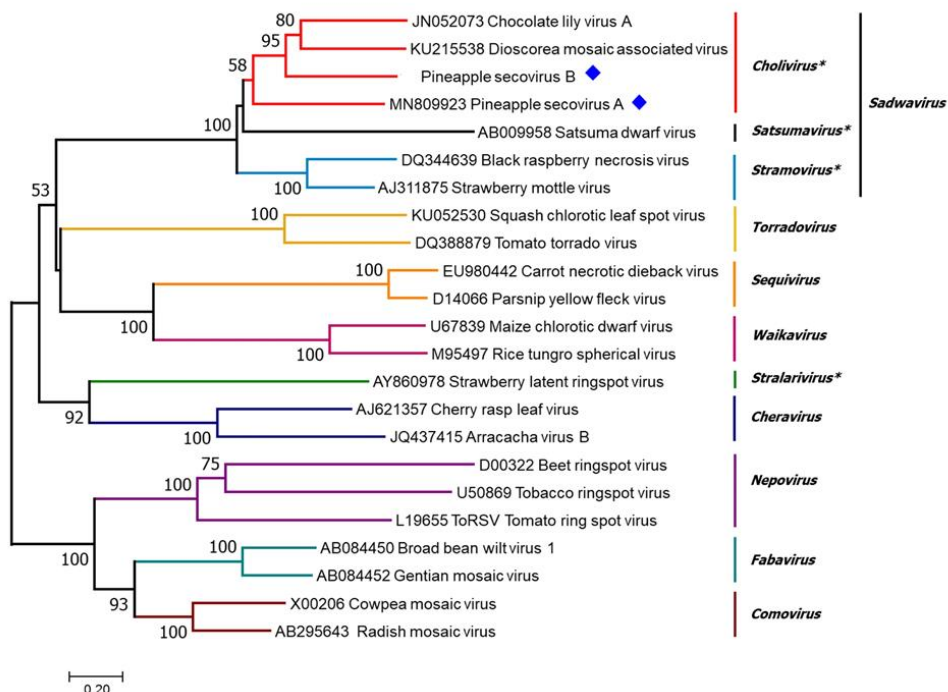


Figure 26 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les espèces et les genres de la famille des Secoviridae sur la base de la séquence d'acides aminés des domaines conservés de la région protéique Pro-Pol des membres des deux espèces de *Sadwavirus* caractérisées sur ananas et reconnues par l'ICTV, pineapple secovirus A (PSVA) et PSVB (en losange bleu). Les astérisques représentent les sous-genres du genre *Sadwavirus* et le nouveau genre récemment établi. (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022a modifié)

Peu d'information sur les *Sadwavirus* sont disponibles dans la littérature. Il est décrit que les *Secoviridae* sont transmis par des nématodes et des insectes comme des pucerons comme c'est le cas pour certains *Sadwavirus* (Fuchs *et al.*, 2022).

3.4 Orthospovirus

La maladie des taches jaunes de l'ananas est provoquée par le **Tomato spotted wilt virus (TSWV, *Orthospovirus tomatomaculae*** ; famille des *Tospoviridae*, genre *Orthospovirus*) (Abudurexiti *et al.*, 2019), qui est très prévalent sur les cultures maraîchères. Le TSWV a été décrit pour la première fois sur ananas à Hawaï en 1926 (Linford, 1932), puis au Philippines, en Australie (Lewcock, 1937) et en Afrique du Sud (Keetch, 1977). Depuis lors, il n'a **plus été décrit sur ananas**. Le TSWV est transmis par des thrips du genre *Frankliniella* qui sont peu prévalents sur ce fruit, ce qui limite la propagation de la maladie (Pappu *et al.*, 2009).

Le TSWV affecte surtout les jeunes plants, et les fruits au niveau de la couronne (Linford, 1943). Il provoque l'apparition de **taches jaunes** sur la face supérieure des feuilles, accompagnées de marques plus sombres au centre (**Figure 27 A**) (Collins, 1960). Puis, une pourriture se développe à la base des feuilles et au niveau de la couronne, pouvant entraîner une déformation du fruit et la mort du plant. Les infections peuvent également se situer au niveau des fleurs entraînant le développement de grandes cavités noircies sur le côté du fruit (**Figure 27 B**).

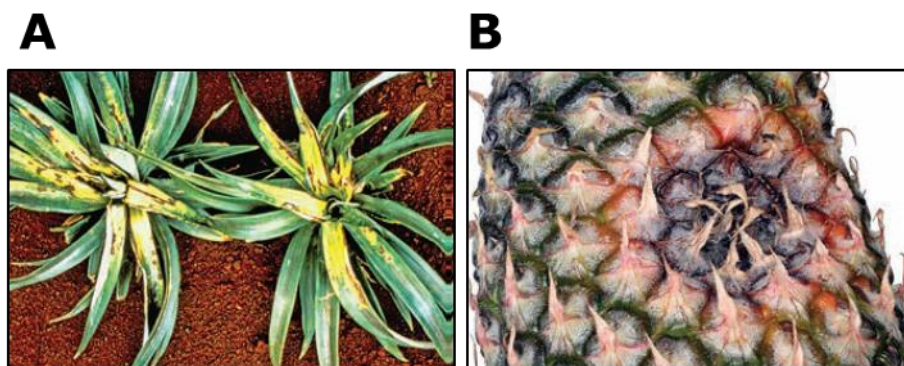


Figure 27 : Taches jaunes sur feuilles et nécroses sur fruit provoquées par le TSWV sur ananas. (Cooke *et al.*, 2009)

Le TSWV est un virus enveloppé (Adkins, 2000) dont le génome divisé est composé de trois molécules d'ARN linéaire simple brin de polarité négative dénommées grand (L ; 8,8 kb), moyen (M ; 4,8 kb) et petit (S ; 3 kb) en fonction de leur taille (de Haan *et al.*, 1991; Margaria *et al.*, 2014). L'ARN S code pour la nucléocapside virale (N), dont la séquence est couramment utilisée pour les analyses phylogéniques.

4 – Diagnostic des maladies virales de l'ananas : apport de la technologie HTS

L'étude des virus de l'ananas bénéficie depuis plusieurs décennies des apports réguliers de nouvelles technologies. Au début des années 60, des preuves circonstancielles suggéraient l'implication d'un virus dans l'apparition de symptômes foliaires, mais cette association n'a pu être prouvée que grâce à l'avènement de la microscopie électronique (Sether and Hu, 2002a), puis au développement des techniques de diagnostic sérologique de type ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Le *Tissue Blot Immunoassay* (TBIA) a pour sa part permis le diagnostic de terrain à haut débit des PMWaV (Hu *et al.*, 1997). Dans les années 1980, les faibles titres de PMWaV dans les plantes et la présence de *Closteroviridae* dans des plantes asymptomatiques ont poussé à la mise au point de diagnostics moléculaires plus spécifiques et plus sensibles par PCR puis par PCR quantitative.

4.1 Diagnostic moléculaire des virus de l'ananas

Le diagnostic des virus connus d'ananas repose sur des techniques **immunologiques** et **moléculaires**, qui permettent une détection **avec a priori** d'un ou plusieurs virus cibles, mais ne permettent pas celle de virus encore inconnus.

Concernant les ampelovirus, aucun réactif sérologique n'est commercialisé. Il existe cependant des outils moléculaires spécifiques permettant la détection des PMWaV1, 2, 3, 5 et 6. Par exemple, des tests PCR conventionnels spécifiques

(Gambley *et al.*, 2008b; Larrea *et al.*, 2022b; Sether *et al.*, 2005a) ou dégénérées (Gambley *et al.*, 2008b), ou des PCR quantitative par reverse transcriptase PCR quantitative (RT-qPCR), utilisant des sondes TaqMan® permettent la quantification précise des titres des PMWaV1 et 2 (Dey *et al.*, 2012; Subere *et al.*, 2011a). Enfin, l'amplification isothermique à médiation par boucle (LAMP) permet pour sa part un diagnostic de terrain plus sensible que le TBIA et, combinée à l'utilisation de nanoparticules d'or, la détection rapide de faibles titres (10 copies) de PMWaV1 et PMWaV2 (Fujiwara and Ikeshiro, 2017).

Concernant les badnavirus, le diagnostic par PCR utilise principalement des amorces dégénérées (Badna-1A et Badna 4), et cible des régions hautement conservées correspondant aux domaines RT/RNaseH de la polymérase (Geering *et al.*, 2000; Geering *et al.*, 2005). Grâce à cette approche, la diversité et la distribution de nombreux badnavirus, dont ceux qui infectent *Ananas comosus*, ont été caractérisées dans diverses régions du monde (Bousalem *et al.*, 2008; Gambley *et al.*, 2008a). Cependant, le diagnostic par PCR directe ne permet pas de différencier les séquences *Caulimoviridae* endogènes (ECV) (Vassilieff *et al.*, 2023) intégrées dans le génome des plantes hôtes, des formes épisomales encapsidées dans des particules virales. Pour cela, des techniques d'immunocapture PCR (IC-PCR) qui couplent l'immunocapture des virions et l'amplification par PCR d'une partie du génome viral encapsidé, ont été mises au point (Le Provost *et al.*, 2006) et optimisées chez l'ananas pour la détection spécifiques du PBCOV ou du PBERV (Gambley *et al.*, 2008a).

Enfin, concernant le diagnostic des sadwavirus, des amorces spécifiques ont été développées (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022a; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b). La détection du TSWV, quant à elle, peut être réalisée indistinctement à l'aide de techniques sérologiques (Johansen *et al.* 2003) ou moléculaires par RT-PCR (Boonham *et al.*, 2002) ou RT-qPCR (Mortimer-Jones *et al.*, 2009).

4.2 Apport des HTS

Les techniques d'indexation innovantes et **sans a priori**, basées sur le **séquençage haut débit (HTS)**, sont utilisées depuis plusieurs années pour contrôler l'état sanitaire de matériel végétal élite destiné à être multiplié *in vitro* et/ou conservé dans des collections de ressources génétiques (Boonham *et al.*,

2014; Massart *et al.*, 2014; Stobbe and Roossinck, 2014). La diminution des coûts et l'émergence de nouvelles approches de séquençage (Sun *et al.*, 2022) rend aujourd'hui envisageable de les utiliser également pour le **diagnostic à haut débit**.

4.2.1 La métagénomique virale

La **métagénomique virale** permet de caractériser l'ensemble des séquences virales (virome) présentes dans un même échantillon (Adams *et al.*, 2009; Roossinck, 2015; Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). Elle s'appuie sur le séquençage à haut débit, nommé également séquençage de nouvelle génération ou '*next generation sequencing*' (NGS) ou encore '*High-Throughput Sequencing*' (HTS), et sur des outils de bio-informatique (*pipelines*) permettant de sélectionner, assembler et trier les séquences d'origine virales présentes dans les jeux de données (*datasets*) de séquençage. Cette approche est largement utilisée pour **découvrir de nouveaux virus** ou de nouvelles souches virales dans des échantillons biologiques d'origines très diverses (animale, végétale, bactérienne, environnementale...), ou pour **étudier la structuration de communautés virales** à des échelles elles aussi très diverses (de la cellule à l'écosystème). La **Figure 28** résume les différentes étapes de caractérisation par métagénomique des viromes de communautés de plantes (Maclot *et al.*, 2020).

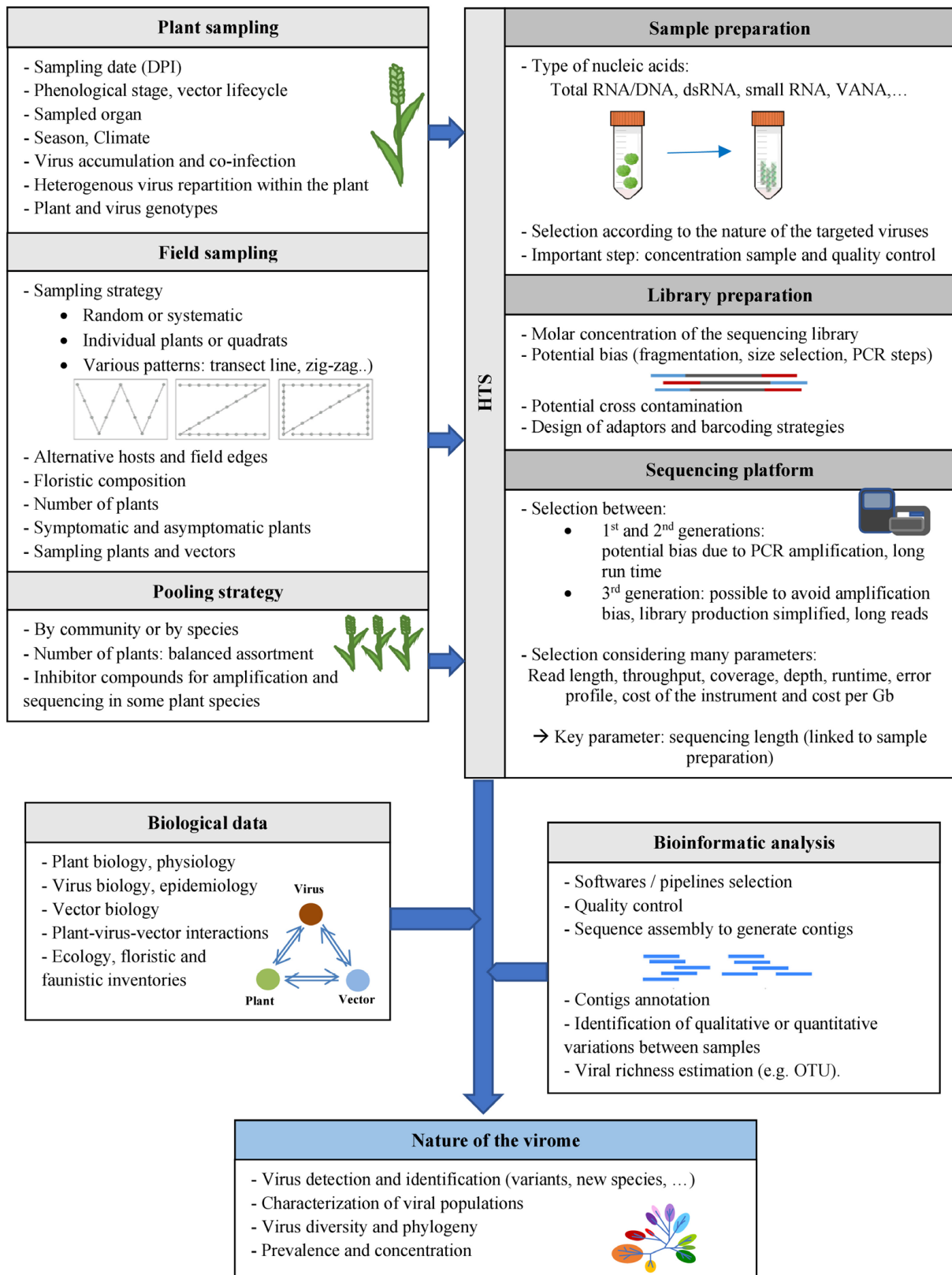


Figure 28 : Méthodes de caractérisation des viromes de communautés végétales.
(Maclot et al., 2020)

4.2.2 Types d'acides nucléiques utilisables en métagénomique virale

Les virus de plantes ont un génome constitué d'ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive ou négative, d'ARN double brin (ARNdb), d'ADN simple-brin (ADNsb) ou d'ADNdb rétrotranscrit (**Figure 29**) (Roossinck *et al.*, 2015). La première étape des techniques de métagénomique virale est une étape d'enrichissement des échantillons en acides nucléiques viraux destinée à accroître la proportion de séquences virales obtenues par séquençage sans *a priori* (Delwart, 2007).

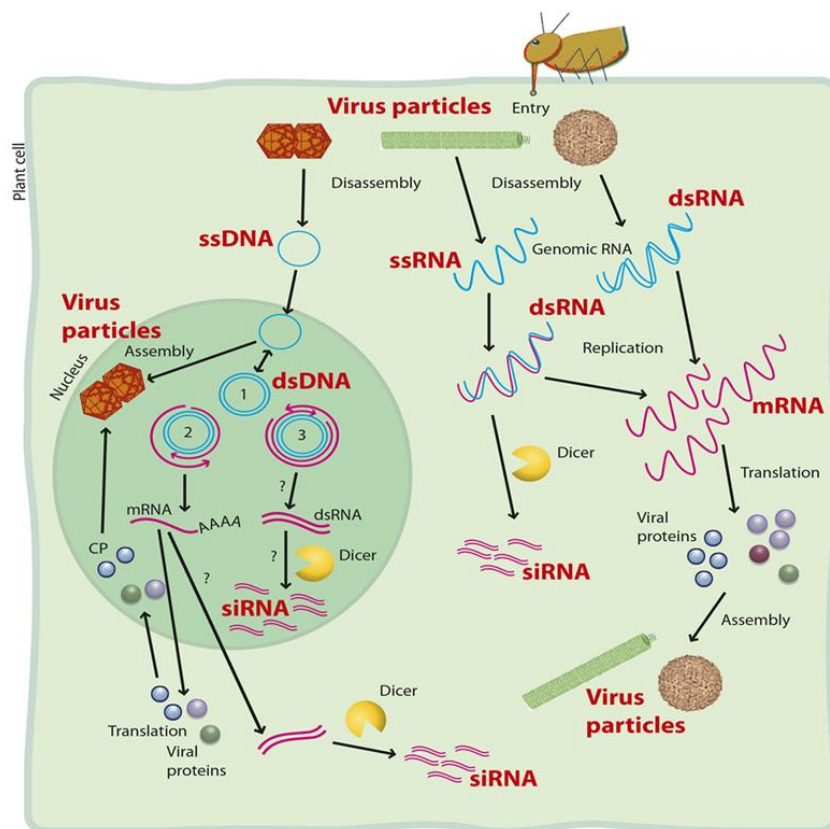


Figure 29 : Représentation schématique d'une cellule végétale infectée par un phytovirus, illustrant la diversité des acides nucléiques pouvant servir de cible aux approches métagénomique. (Roossinck *et al.*, 2015)

Quatre types de matrices peuvent être utilisées pour le séquençage à haut débit: **i)** des ARN totaux éventuellement ribodéplétés ou des ADN totaux, **ii)** des ADN ou ARN génomiques viraux purifiés à partir de particules virales purifiées, **iii)** des ARN double brins et **iv)** de petits ARN issus du mécanisme de *silencing* (**Figure 29**) (Roossinck *et al.*, 2015).

Chacun de ces quatre types de matrices présente des avantages et des inconvénients (Roossinck *et al.*, 2015), résumés dans le **Tableau 2** (Maclot *et al.*, 2020), et des risques de biais qui peuvent être limités par la combinaison de plusieurs techniques (Candresse *et al.*, 2014).

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents types de matrices de séquençage pour la métagénomique virale. (Maclot *et al.*, 2020)

Nucleic acids	Total RNA	dsRNA	Small RNA (21, 22, 24 nt)	VANA
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> • Detection of any RNA or DNA virus and viroids. • For individual plants and pooled samples. 	<ul style="list-style-type: none"> • All RNA viruses including viroids. • Enrichment of viral sequences in the data. • For individual plants and pooled samples. 	<ul style="list-style-type: none"> • Screen any kind of virus and viroid targeted by silencing mechanism. • For individual plant samples. 	<ul style="list-style-type: none"> • All viral particles, detection of DNA and RNA viruses. • Enrichment of viral sequences in the data. • For individual plants and pooled samples.
Drawbacks	<ul style="list-style-type: none"> • High sequencing depth is needed as there is a high background of rDNA (even with depletion of ribosomal RNAs). • No enrichment of viral sequences. • Limited sensitivity to detect viruses in low concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Labor intensive. • Limited or no detection of DNA viruses. • Introduction of technical bias (enrichment) for quantification of variants and species. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cumbersome extraction methods (Trizol and CTAB-based). • Difficult annotation of sequences and genome reconstruction due to the small size of the sequences. • Only detects actively replicating agents targeted by plant silencing. • Many viruses can have very low sRNA titer in woody crops. • Not yet applied on sample pools for ecological studies. • Complicated assembly requires high sequencing depth in order to be able to assemble and identify viruses. • No enrichment of viral sequences. • Limited sensitivity to detect viruses in low concentration. 	<ul style="list-style-type: none"> • In theory, no detection of viroids or virus nucleic acid not encapsided or with unstable particles. But endornaviruses were demonstrated to be detected with this technique. • Introduction of technical bias (enrichment) for quantification of variants and species. • Highly variable in recovery of viruses.

- ARN et ADN totaux

L'utilisation d'ARN ou ADN totaux s'est révélée très efficace pour la découverte de nouveaux phytovirus, y compris dans des mélanges d'échantillons grâce à des approches multiplexes (Roossinck *et al.*, 2015). Leur principal inconvénient est qu'une proportion très élevée des séquences nucléiques obtenues par HTS n'est pas d'origine virale. L'ARN total a néanmoins été utilisé dans des approches de séquençage de troisième génération, notamment par le séquenceur MinION, pour la caractérisation de virus infectant le blé (Fellers *et al.*, 2019) ou le lys (Lee *et al.*, 2022).

- **ARN ribodéplété (rRNAd)**

Chez les plantes, l'ARN total est constitué d'environ 80 à 90% d'ARN ribosomal (ARNr) (Boone *et al.*, 2018). Bien que les *reads* d'ARNr puissent être éliminés au cours de l'analyse bio-informatique, leur présence réduit la proportion de *reads* d'origine virale et par conséquent la sensibilité de la détection de virus. L'élimination des ARNr (ribodéplétion) avant le séquençage permet l'enrichissement d'un échantillon en ARN viraux (Adams *et al.*, 2009; Massart *et al.*, 2014). Elle peut être effectuée par capture (Thompson *et al.*, 2020) ou par coupure (Phelps *et al.*, 2021). Dans les deux cas, les ARNr présents dans les extraits d'ARN totaux sont hybridés à des amorces complémentaires marquées puis éliminés. Cette approche a été utilisée avec succès pour caractériser le virome des pommiers (Nabi *et al.*, 2022) ou des figuiers (Beste *et al.*, 2023).

La synthèse spécifique d'ADN complémentaire (ADNc) des seuls ARN viraux, par reverse transcription, permet également un enrichissement en séquences virales. Elle repose sur l'utilisation d'amorces spécifiques (TARget-SPECific Reverse Transcript, TASPRT) (Espindola *et al.*, 2021) ciblant tous les virus à ARN d'intérêt.

- **Acides nucléiques extraits de virions purifiés (VANA)**

L'approche la plus utilisée dans les études de métagénomique virale est basée sur l'extraction des acides nucléiques viraux après une étape d'enrichissement en particules virales (*virion-associated nucleic acids*, ou VANA) (Moubset *et al.*, 2022). Elle comporte quatre étapes : i) centrifugation, ii) filtration iii) traitement de l'échantillon par des nucléases afin d'éliminer les acides nucléiques non encapsidés, et iv) extraction des acides nucléiques encapsidés (Hall *et al.*, 2014). Cette technique permet un multiplexage important et l'identification de virus à génome ADN ou ARN (Candresse *et al.*, 2014). En revanche, elle exclut les virus dont le génome n'est pas encapsidés (Candresse *et al.*, 2014). Elle a été utilisée par exemple pour caractériser le virome dans des communautés de Poacées (Maclot *et al.*, 2023), de carottes sauvage (Schönegger *et al.*, 2023), ou encore chez la tomate (Temple *et al.*, 2023).

- **ARN double brin (ARNdb)**

Les ARN double brin regroupent les intermédiaires de réplication des virus à génome ARN simple brin et les ARN génomiques des virus à génome double brin, qui sont rares chez les plantes (famille des *Reoviridae*). Ils ont donc une origine strictement virale et sont par conséquent des cibles de choix pour les approches de métagénomique virale (Roossinck *et al.*, 2010). La principale limitation à leur utilisation est qu'ils excluent théoriquement les virus à génome ADN (Roossinck *et al.*, 2010). Cependant, des données récentes montrent que certains virus à génome ADN peuvent être identifiés à partir d'ARNdb (Kutnjak *et al.*, 2021). En revanche, cette méthode ne semble pas efficace pour la détection de virus à génome ARNs de polarité négative (Kutnjak *et al.*, 2021). L'approche **dsRNA** a notamment permis l'étude du virome de la tomate (Ma *et al.*, 2020), du taro (Olmedo-Velarde *et al.*, 2022), ou encore du fruit de la passion (Sepúlveda *et al.*, 2022).

- **Petits ARN issus du *silencing***

Les petits ARN résultent du mécanisme d'ARN *silencing* ou ARN interférence (*small interfering RNA* – siRNA), induit par la présence d'ARNdb et aboutissant à la dégradation séquence-spécifique des ARN ciblés. L'ARN *silencing* joue un rôle majeur dans la défense antivirale. Chez les plantes, le séquençage haut débit des petits ARN (21 à 24 nucléotides) permet d'identifier des virus connus et inconnus, et d'assembler des séquences génomiques virales totales ou partielles (Kreuze *et al.*, 2009). Cette approche peut être mise en œuvre pour détecter un large spectre de virus indépendamment de la nature (ARN ou ADN) et de la structure (linéaire, circulaire, simple ou double brin) de leur génome. Généralement, trois étapes sont nécessaires avant la construction de la librairie de séquençage : i) extraction des ARN totaux, ii) purification des ARN de 20 à 30 nucléotides après séparation des ARN totaux par électrophorèse en gel d'acrylamide ou filtration sur colonne, et iii) ligation d'adaptateurs aux extrémités 3' et 5' des petits ARN avant transcription inverse (Kreuze *et al.*, 2009). Au-delà du côté laborieux associé à sa mise en œuvre et de l'impossibilité de multiplexer, l'utilisation de cette approche peut s'avérer limitante pour détecter des virus qui déclenchent une faible synthèse de siRNA ou l'inhibent.

4.2.3 Les techniques de séquençage haut débit

Depuis les années 2000, les HTS ont permis l'émergence des approches de génomique. Des techniques HTS de seconde (SGS) et de troisième (TGS) générations ont été développées et sont aujourd'hui largement utilisées. Elles ont chacune des avantages et des inconvénients (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Comparaison des performances de quatre plateformes de séquençage HTS.
(Sun et al., 2022)

Sequencing platform	Sequencing principle	Average length	Merits	Faults
Illumina ^a	Sequencing by synthesis; fluorescently labeled dNTPs	≤300 bp	High accuracy	Short reads, high capital cost, time-consuming
Thermo Fisher's Ion Torrent ^a	Sequencing by synthesis; detection of hydrogen ions	≤300 bp	High accuracy	Short reads, high capital cost, time-consuming
Pacific Biosciences ^b	Sequencing by synthesis; SMRTbell replication	3 kb	Long reads	High capital cost, variable accuracy, time-consuming
Oxford Nanopore ^b	Measure the changes in current as biological molecules pass through the nanopore	9 kb-10 kb	Long reads, low capital cost, portable	Low accuracy

^aNGS platform.

^bsingle molecular sequencing platform.

4.2.3.1 Séquençage de deuxième génération (SGS)

La technologie **Illumina** est actuellement la plus utilisée des SGS. Elle repose sur trois étapes : i) préparation des banques d'ADN ii) amplification des molécules d'ADN et iii) séquençage.

Dans le cas de virus à ARN, une étape préalable de synthèse d'ADNc à partir des ARN purifiés, par transcription inverse, est nécessaire. Les opérations suivantes, communes à tous les types d'échantillons, consistent à construire des banques

d'ADN ou d'ADNc (nommées bibliothèques ou *libraries*) avec l'ajout d'adaptateurs (**Figure 30**) permettant le séquençage (Van Dijk *et al.*, 2014), et à amplifier les séquences des banques par PCR (Barba *et al.*, 2014; Metzker, 2010) grâce à des adaptateurs complémentaires fixés sur un support solide appelé 'flowcell'.

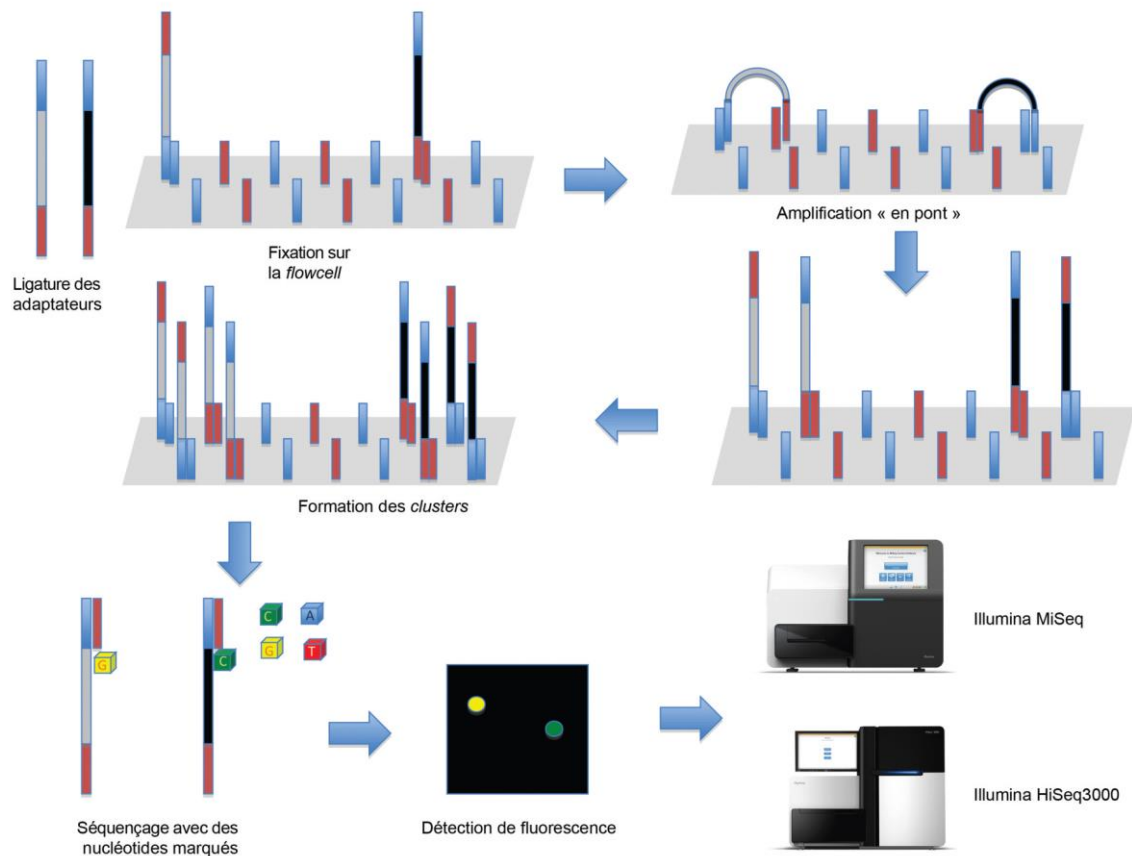


Figure 30 : Principe de séquençage HTS de la technologie Illumina. (Dortet *et al.*, 2017)

Dans le cas des PCR par pont sur phase solide par exemple, après liaison des ADN fragmentés aux adaptateurs, l'extrémité libre de chaque fragment s'hybride à un adaptateur complémentaire situé à proximité, formant ainsi une structure en pont. Ce pont d'amplification initie alors la synthèse du brin complémentaire. En procédant à des cycles multiples, on obtient plusieurs milliers de copies de la même séquence d'ADN clustérisées sur une plaque. Enfin, le brin d'ADNc des séquences fixées sur le support est synthétisé à l'aide de nucléotides marqués par des fluorochromes qui, au moment de leur intégration, émettent une fluorescence à une longueur d'onde spécifique du nucléotide marqué, permettant de déduire

l'enchaînement des bases. Les séquences générées, appelées '*reads*', sont courtes (100 à 300 pb), ce qui peut constituer un problème lors de l'étape d'assemblage en séquences plus longues (contigs), et/ou dans des parties riches en séquences répétées, comme les éléments transposables ou certaines séquences virales endogènes (Alkan *et al.*, 2011). Des défaillances du clivage du fluorochrome, ou des différences insuffisantes entre leurs spectres d'émission, peuvent gêner l'interprétation des signaux émis, et conduire à des erreurs de séquençage qui cependant reste très faible (Dohm *et al.*, 2008).

L'étape d'amplification peut générer des produits chimériques (recombinants artificiels) (Lasken and Stockwell, 2007), des biais quantitatifs modifiant les fréquences relatives des virus présents (Gallet *et al.*, 2017), ou encore des contaminations entre échantillons (Sinha *et al.*, 2017). L'ajout d'un contrôle 'alien' correspondant à un échantillon de plante préalablement séquencé et contenant un ou plusieurs virus de plante exotiques qui ne devraient pas être présents dans les échantillons testés, permet d'évaluer la présence d'éventuelles contaminations entre échantillons (Massart *et al.*, 2022; Rong *et al.*, 2023). Cet 'alien' doit être introduit le plus tôt possible dans le processus, par exemple dès la collecte des échantillons ou lors de l'étape d'extraction des acides nucléiques (Rong *et al.*, 2023). Il permet aussi d'appliquer des seuils de détection définis pour maximiser la sensibilité de détection, sans entraîner un taux élevé de faux positifs. On peut également rajouter des témoins contenant des matrices d'ADN en quantité connues, ou des témoins négatifs.

Afin de pallier les limitations de tailles de *reads* associées aux SGS, rendant difficile leur assemblage en plus longue séquence, de nouvelles techniques de séquençage dites de troisième génération ont été développées.

4.2.3.2 Séquençage de troisième génération (TGS)

Les TGS permettent de générer des *reads* de longue taille (*long reads*), pouvant atteindre plusieurs dizaines de kilobases, et de séquencer directement des molécules d'ADN, sans amplification préalable. Il existe deux techniques de TGS : i) Pacific Biosciences (PacBio) qualifié de séquençage en temps réel d'une molécule unique (*single-molecule real-time sequencing*; SMRT) (Eid *et al.*, 2009), et ii)

Oxford Nanopore Technologies (ONT) notamment avec le **MinION** (Branton *et al.*, 2008).

Le principe de séquençage de **Nanopore** repose sur la mesure de la variation de champ électrique durant la translocation de la molécule d'ADN simple brin à travers un pore protéique nanoscopique (**Figure 31**) (Goodwin *et al.*, 2017; Magi *et al.*, 2018). La variation de conductivité électrique produite au passage de chaque base du fragment d'ADN est spécifique, et permet ainsi de déduire la composition de la séquence lors de l'appel de base (*base calling*) (Magi *et al.*, 2018).

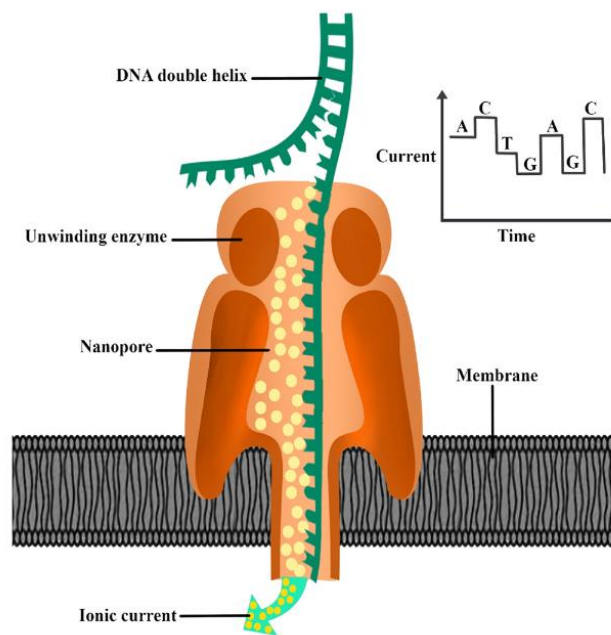


Figure 31 : Principe du séquençage Nanopore. (Shivashakarappa *et al.*, 2022)

Les nanopores sont regroupés par quatre, sous forme de canaux. Chaque unité de 512 canaux forme une cartouche jetable appelé cellule d'écoulement ou '*flowcell*'. Chaque canal mesure le signal de courant généré par l'un des quatre pores à la fois, ce qui permet de traiter jusqu'à 512 molécules d'ADN simultanément à une vitesse de 450 bases par secondes (Magi *et al.*, 2018). Oxford Nanopore commercialise sa technologie sous plusieurs formes, dont le dispositif MinION, de très petite taille, facile à transporter et de faible coût, mais qui ne peut accueillir qu'une seule *flowcell*. L'inconvénient majeur de cette technologie est son taux d'erreur qui varie entre 10 et 30 % (Lee *et al.*, 2014). Cependant, des algorithmes de correction d'erreur, une chimie et des *flowcells* en constante évolution, permettent au fil du temps de réduire ces erreurs.

4.2.4 Traitement bio-informatique des données de séquençage

Les technologies SGS et TGS s'appuient sur des outils (*pipelines*) bio-informatiques spécifiques, capables d'assembler et de synthétiser la grande quantité de données générées. De nombreux algorithmes capables de gérer des lectures courtes ou longues, de corriger les erreurs de lecture, de réaliser l'assemblage de génomes *de novo* et de détecter des polymorphismes mononucléotidiques (SNP) ont été développés, chacun étant adapté à une technologie de SGS ou TGS. Des programmes corrigeant les biais introduits pendant la préparation des banques ont également été mis au point. La **Figure 32** présente un exemple de *pipeline* bio-informatique classique de traitement des données de SGS et TSG (Jeon et al., 2023).

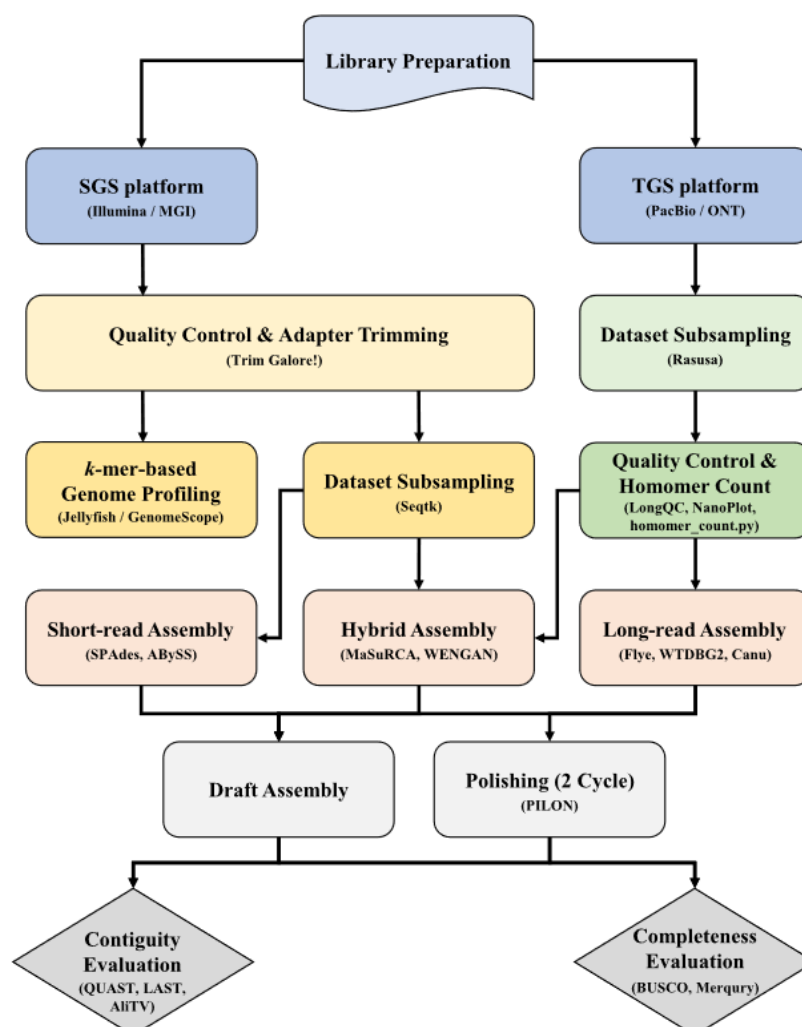


Figure 32 : Représentation schématique d'un *pipeline* décrivant les étapes principales d'une étude de séquençage HTS. (Jeon et al., 2023)

L'analyse bio-informatique peut-être schématiquement subdivisée en quatre étapes : i) contrôle qualité des séquences obtenues, ii) assemblage en contigs, iii) caractérisation des contigs, et iv) identification de variations dans ou entre les échantillons.

L'étape d'assemblage des *reads* (assemblage *de novo*) permet de grouper les *reads* présentant des zones identiques et chevauchantes en séquence consensus appelée contig (**Figure 33**). Ces contigs sont des séquences plus longues que celles du jeu de données brutes et permettent idéalement l'obtention de génomes entiers. Cependant, du fait de la difficulté de séquencer certaines régions génomiques et des biais spécifiques des assembleurs disponibles, l'obtention de séquences génomiques virales complètes reste complexe, en particulier pour des virus appartenant à des genres mal décrits voire inconnus (Krishnamurthy and Wang, 2017; Scholz *et al.*, 2012). La majorité des séquences obtenues (60 à 95%) dans le cadre d'études de métaviromique reste alors bien souvent non-identifiée et se retrouve dans la catégorie appelé '*dark matter*' ou matière noire (Roux *et al.*, 2015).

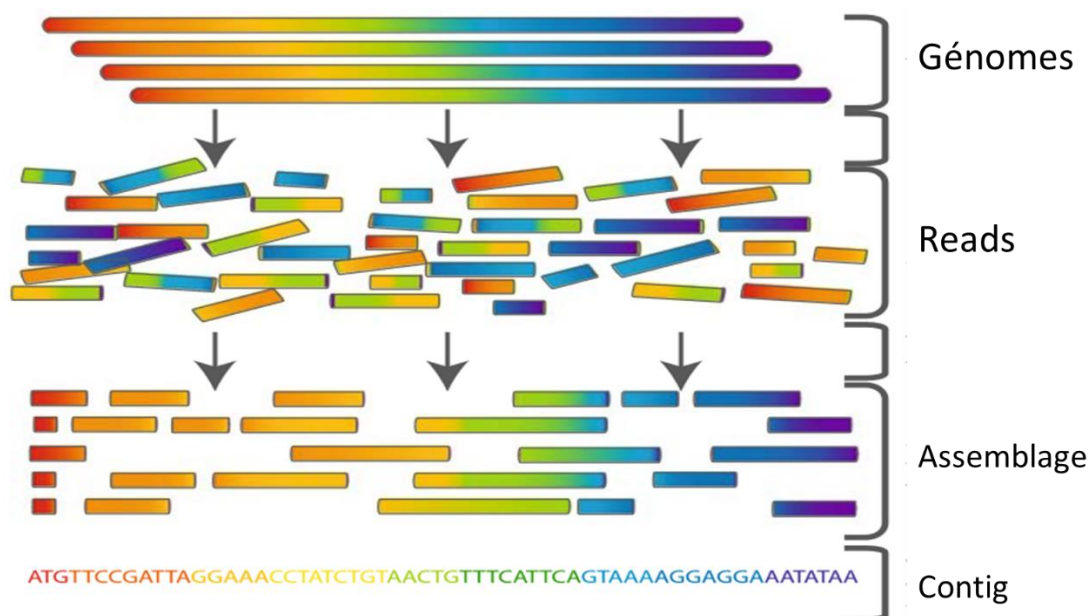


Figure 33: Représentation schématique du principe d'assemblage des reads.
(Commins *et al.*, 2009)

L'étape suivante consiste à identifier l'organisme dont proviennent les séquences, c'est l'assignation taxonomique. Elle est effectuée sur la base de similarités de séquence en comparaison avec des bases de données (BLAST et ses dérivés). Une fois les séquences assignées, elles sont généralement regroupées en cluster, virotype ou OTU (*Operational Taxonomic Unit*), en fonction d'un pourcentage d'identité défini par les règles de taxonomie. Il est alors possible de procéder à des mesures de diversité de la composition taxonomique d'un échantillon.

Une fois que le génome est assemblé et caractérisé, on peut le considérer comme un génome de référence sur lequel on peut positionner les *reads* issus du séquençage : cette étape est appelée alignement ou '*mapping*'. Lorsque le *read* est suffisamment long, il peut généralement être aligné sur le génome avec une bonne certitude, en tolérant une certaine quantité de non-concordances (*mismatches*), c'est-à-dire de nucléotides mal appariés. Néanmoins certaines séquences répétées du génome peuvent s'avérer plus difficiles à aligner. On désigne par '*profondeur de séquençage*' (*sequencing depth*) le nombre moyen de *reads* alignés par position sur le génome. Plus cette profondeur est importante, meilleure est la qualité de l'alignement, et plus les analyses ultérieures seront de qualité.

5 - La maladie dite du '*wilt*' de l'ananas ou MWD

La maladie du dépérissement de l'ananas, dite du '*wilt*' (***Mealybug wilt disease of pineapple, MWD***), est la principale contrainte virale actuelle au niveau mondial pour la culture de l'ananas (Hu *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2006; Rohrbach and Schmitt, 2003). Elle contribue à la réduction des rendements dans tous les pays producteurs (Hernández-Rodríguez, 2017; Sether and Hu, 2002b). Elle serait due à un **complexe de virus** véhiculés par les **cochenilles farineuses**, qui vivent en association avec les fourmis (Dey *et al.*, 2015). La maladie touche toutes les parties de la plante : système racinaire, feuilles et fruits qui sont atrophiés et non commercialisables.

5.1 Distribution géographique de la MWD

La MWD a été décrite pour la première fois dans le sud de la Floride, aux Etats-Unis, en 1779, et était associée à la présence de cochenilles et d'autres insectes dans les plantations d'*Ananas comosus* var. *comosus* (Westgate, 1945). Par la suite, une maladie similaire a été décrite à Hawaï en 1910, également associée à une forte infestation en cochenilles (German *et al.*, 1992; Larsen, 1910). En 1920, des plantations entières y auraient été dévastées, et en 1930, l'impact de la maladie était tel qu'elle a menacé l'industrie de l'ananas dans ce pays (Gambley and Thomas, 2015). Sa présence a été signalée par la suite, dans la plupart des zones de production d'ananas du monde (**Figure 34**) (Moreno *et al.*, 2023).

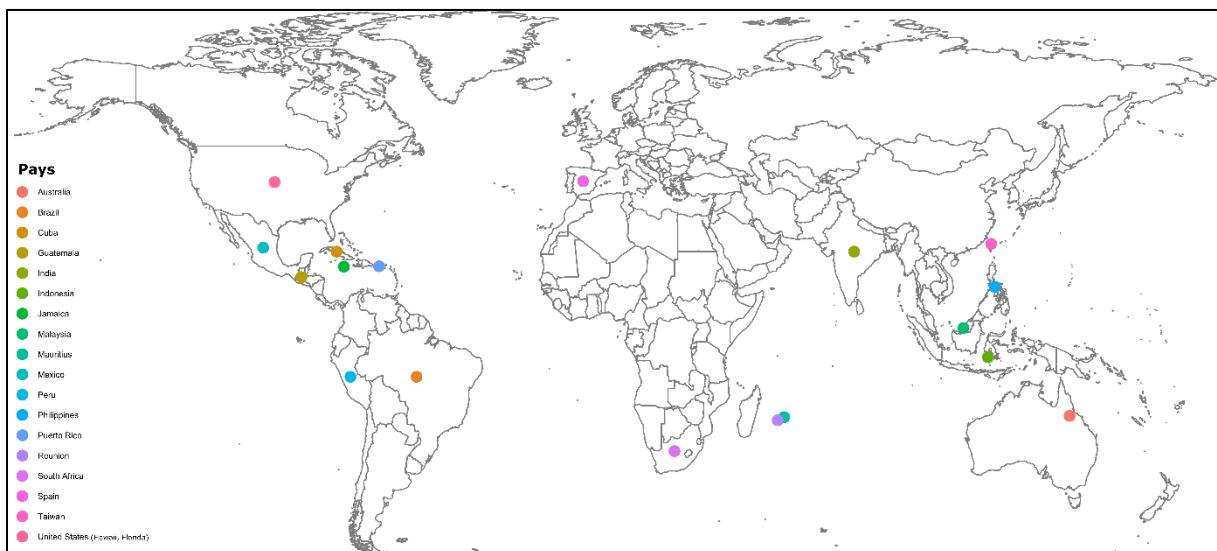


Figure 34 : Signalements de la MWD dans le monde. (Issu des données de Cabi, Novembre 2021)

5.2 Symptômes de la MWD

Sur *Ananas comosus* var. *comosus*, un fort **rougissement** des feuilles est considéré comme le **symptôme caractéristique** de la MWD (**Figure 35 A**) (Carter, 1933; Py *et al.*, 1984). En parallèle, les apex se courbent vers le bas et se dessèchent, entraînant le dépérissement des feuilles. Une réduction drastique de la masse racinaire se produit également et provoque la détérioration progressive de la plante (Sether and Hu, 2002b).

Dès 1933, Carter a défini **quatre stades de développement** de la MWD sur plants adultes, appartenant au cultivar 'Cayenne lisse', lors d'une comparaison avec le flétrissement dû à la sécheresse (Carter, 1933; Py *et al.*, 1984) :

1) rougissement progressif des feuilles du 3^{ème} et 4^{ème} rang à partir du cœur (**Figure 35 A**) ; les marges des feuilles tendent parfois à **s'incurver** vers la face inférieure, mais leurs extrémités restent érigées.

2) changement de la coloration rouge des feuilles vers une couleur rose vif et jaune (**Figure 35 B**), perte de turgescence leur donnant un aspect flétri, tandis que leurs sommets commencent à prendre une couleur brunâtre, avec parfois apparition de taches plus ou moins nécrotiques ; occasionnellement les bords du limbe s'incurvent vers la face inférieure.

3) les feuilles intermédiaires (rangs 4 et 5) s'incurvent vers l'extérieur (**Figure 35 C**), leur bord devient **jaunâtre**, tandis que le reste de la feuille reste rose vif avec une tendance des extrémités à s'enrouler (**Figure 35 E**).

4) les feuilles les plus jeunes du centre de la rosette restent dressées mais perdent leur turgescence, les extrémités de la majorité des autres feuilles sont enroulées. A ce stade final du **flétrissement**, les feuilles sont complètement **desséchées**, s'affaissent, et la plante se fane (**Figure 35 D**).

Il est rare que la plante atteigne le quatrième stade de développement de la maladie (Carter, 1962; Carter, 1963; Hernández-Rodríguez, 2017). Au deuxième ou troisième stade, la plante meurt, ou reprend sa croissance, de sorte que les symptômes disparaissent et que de nouvelles feuilles vertes poussent, semblables à celles des plantes saines (Cf. paragraphe 5.4.5).

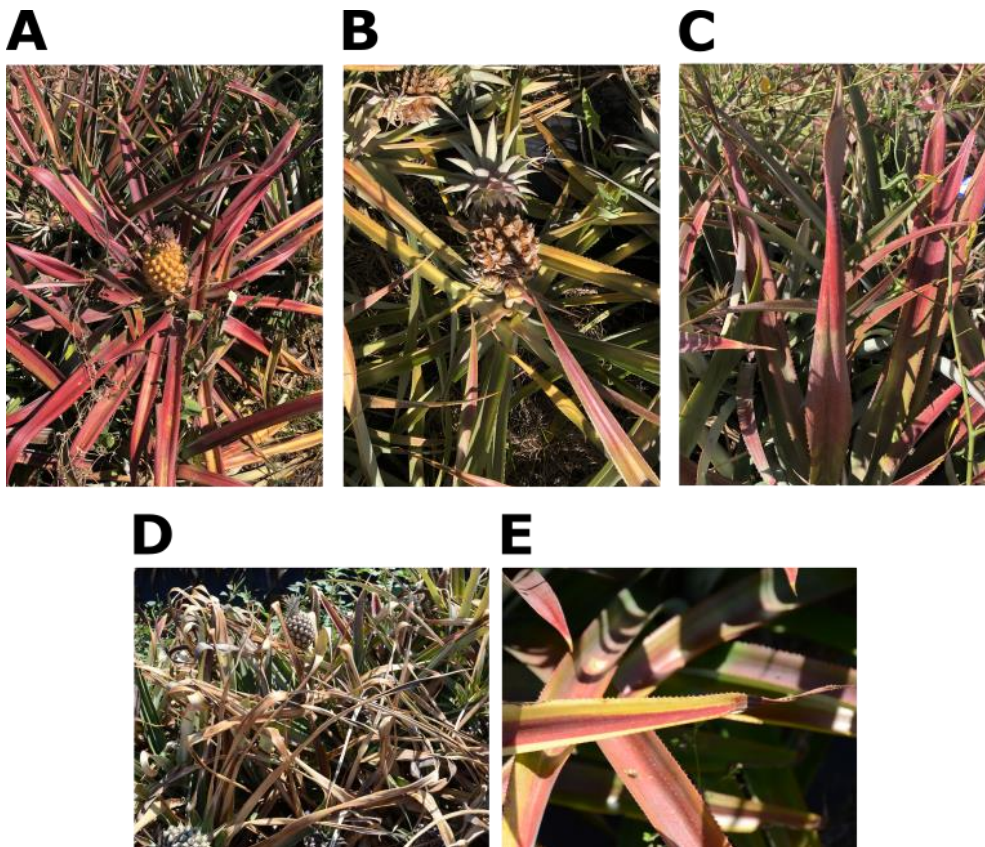


Figure 35 : Symptômes typiques de la MWD sur feuilles d'*Ananas comosus* : (A) rougissement, (B) jaunissement, (C) incurvation, (D) flétrissement, et (E) dessèchement de l'extrémité des feuilles. (Source D. Massé)

Les symptômes de la maladie peuvent varier selon les cultivars, en fonction des niveaux naturels d'anthocyane dans les feuilles (Carter, 1963). Les cultivars à faible teneur en anthocyane présenteront un jaunissement (**Figure 35 B**), plutôt que le symptôme typique de rougissement (**Figure 35 A**) associé au cultivar 'Cayenne lisse' (Carter, 1963). Sur les nouvelles variétés hybrides, les symptômes sont moins sévères et se traduisent par des chloroses jaunes et non par des décolorations rouges à roses observée chez les variétés plus anciennes. Dans les régions fraîches et humides, les différentes nuances de rouge font généralement place à des teintes jaunâtres et les feuilles présentent généralement de grandes taches nécrotiques (Py *et al.*, 1987).

Si l'infestation est précoce, la coloration des feuilles reste généralement verte mais avec des taches ou des zones roses. Si la maladie se manifeste lorsque les plantes ont des inflorescences différenciées, les plantes sèchent. Lorsque la maladie apparaît plus tardivement, les feuilles du fruit restent saillantes et la chair est fibreuse et acide (Sether and Hu, 2002b).

La MWD a été historiquement décrite comme un flétrissement 'lent' ou 'rapide' (Carter, 1933). Dans le cas du flétrissement 'rapide', les symptômes de dessèchement et de flétrissement commencent à l'extrémité des feuilles, qui prennent une couleur jaune rougeâtre ou rosâtre, en particulier chez la variété 'Cayenne lisse' (Singh and Sastry, 1974). Ce symptôme ne se développe pas chez les plantes affectées par le flétrissement 'lent'. Quelle que soit la rapidité du flétrissement, les plantes malades peuvent mourir prématurément et ne pas produire de fruits.

Les manifestations foliaires de la maladie ne semblent pas être les premiers symptômes de la MWD (Py *et al.*, 1984). Avant l'apparition de tout changement de couleur des feuilles, ce sont les organes souterrains qui semblent affectés, avec un arrêt de la croissance puis une nécrose progressive des racines entraînant la mort de la plante (Carter, 1962; Carter, 1963; Carter and Collins, 1947; Py *et al.*, 1987).

Les symptômes de la MWD peuvent prêter à confusion avec des symptômes résultant d'autres causes (détaillées dans les paragraphes 2.1 et 2.2) liées au système racinaire (infection par des pathogènes non viraux, anoxie, nutrition), à l'environnement (climat) ou à la plante (sénescence). En effet, le développement de la maladie dépend de l'âge de la plante au début de l'infestation par les cochenilles, les jeunes plantes présentant des symptômes plus rapidement que les plantes plus âgées (Carter, 1945a).

Certaines conditions telles que la sensibilité variétale (Py *et al.*, 1987; Rohrbach and Johnson, 2003), les connaissances des producteurs sur la maladie et sa gestion (Bua *et al.*, 2013; Houndédji *et al.*, 2016), l'âge des plantations (Gambley and Thomas, 2015; Houndédji *et al.*, 2016) et le recyclage du matériel de propagation (Bua *et al.*, 2013) peuvent également influencer directement l'expression des symptômes de la MWD, compliquant ainsi le diagnostic.

5.3 Epidémiologie et incidence de la MWD

L'épidémiologie de la MWD est aussi complexe que son étiologie, et n'est encore que partiellement décrite. L'utilisation généralisée comme matériel de plantation de rejets dépourvus de garantie sanitaire, est le principal facteur de propagation et de maintien des virus, dont ceux qui sont associés à la MWD (Sether *et al.*, 2010). Cependant, les données de prévalence des virus d'ananas demeurent

parcellaires. À Hawaï, dans les années 1990, la prévalence de PMWaV1, 2 et 3 variait significativement selon les cultivars, la présence de symptômes et de cochenilles (Hu *et al.*, 1997; Sether and Hu, 2002a). De nouvelles enquêtes menées à Hawaï en 2005 dans des plantations commerciales d'hybrides du cultivar 'Cayenne lisse' ont montré que les prévalences de PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 variaient de 0 à 40%, selon l'hybride et l'espèce de PMWaV (Sether *et al.*, 2005a). Bien que la prévalence du PMWaV2 à Hawaï soit parfois plus faible que celle du PMWaV1, il a été suggéré qu'ils contribuaient de manière significative aux pertes de rendement des cultures associées à la MWD (Sether and Hu, 2002a, b). L'augmentation de l'incidence des virus dans une parcelle dépend largement de la prévalence de chaque espèce virale au début de la plantation (Sether *et al.*, 2010). Dans les plantations d'Hawaï et d'Australie, les pertes de rendement attribuées à la MWD sont estimées entre 35 à 55% (Sether and Hu, 2002b). Cette estimation varie de 40% à Cuba (Hernández-Rodríguez, 2017), à plus de 50% dans les pays des Petites Antilles (Trinidad-et-Tobago, Sainte Lucie, Saint-Vincent ou la Barbade (Duval *et al.*, 1995), voire 80% au Brésil (Santa-Cecília *et al.*, 2016). Plus les symptômes de la MWD se développent tôt dans les plantes, plus l'impact de la maladie sur les rendements est important (Carter, 1945a). À Hawaï, une diminution de 55% du poids moyen des fruits a été observée dans des plants présentant des symptômes de MWD au cours des trois premiers mois de la plantation, alors que cette réduction n'était que de 7% dans des plantes infectées 14 mois après la plantation (Sether and Hu, 2002b).

La MWD affecte également la qualité des fruits (augmentation de la texture fibreuse et de l'acidité) qui peut rendre les fruits impropres à la consommation en frais (Nieves *et al.*, 1996; Sether and Hu, 2002b), et provoque un asynchronisme de la maturité des fruits qui rend difficile la planification des récoltes, en renchérit les coûts et réduit les rendements (Sether and Hu, 2002b; Sipes *et al.*, 2002). Par exemple, dans des plantes du cv 'Cayenne lisse' présentant des symptômes de MWD à Hawaï, le mûrissement des fruits a lieu dix semaines plus tôt que dans des plantes saines.

A La Réunion, il n'existe pas de données sur la prévalence et l'incidence de la MWD, où les symptômes observés par les planteurs sont des assèchements et des dépérissements des plants qui peuvent empêcher les fruits d'arriver à maturité, sur des surfaces pouvant représenter 80% d'une parcelle entraînant ainsi une diminution du rendement (zinfos974.com, 2015). L'intensité de ces symptômes

varie au cours du temps sur une même parcelle, comme pour de nombreuses autres maladies virales des plantes.

5.4 Etiologie de la MWD

D'après l'ensemble des données disponibles dans la littérature, il semble que l'étiologie de la MWD, qui est définie comme l'étude des causes d'une maladie en fonction de signes ou de symptômes, soit complexe. Cette complexité est attribuée à divers facteurs, à la fois abiotiques et biotiques, qui interagissent.

5.4.1 Virus associés à la MWD : les différentes hypothèses

Carter a proposé dès 1963 qu'un virus latent est impliqué dans l'**étiologie de la MWD** (Carter, 1963). Il a cependant fallu attendre deux décennies pour que des chercheurs parviennent à isoler des particules virales flexueuses et filamenteuses (**Figure 36 A**), ou bacilliformes (**Figure 36 B**) à partir de plants d'ananas présentant des symptômes de MWD à Hawaï (Gunasinghe and German, 1986, 1987, 1989; Hu *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1996). Sur la base de la morphologie des particules virales, de la présence d'ARNdb dans les tissus infectés, et de leurs poids moléculaires, il a été proposé que ces virus appartiennent à la famille *Closteroviridae* (Agranovsky, 1996; Bar-Joseph *et al.*, 1979; German *et al.*, 1992; Gunasinghe and German, 1986, 1989; Hu *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1996), et le nom 'pineapple closterovirus' (PC ou PCV) a été proposé (Hu *et al.*, 1996; Ullman *et al.*, 1989; Wakman *et al.*, 1995).

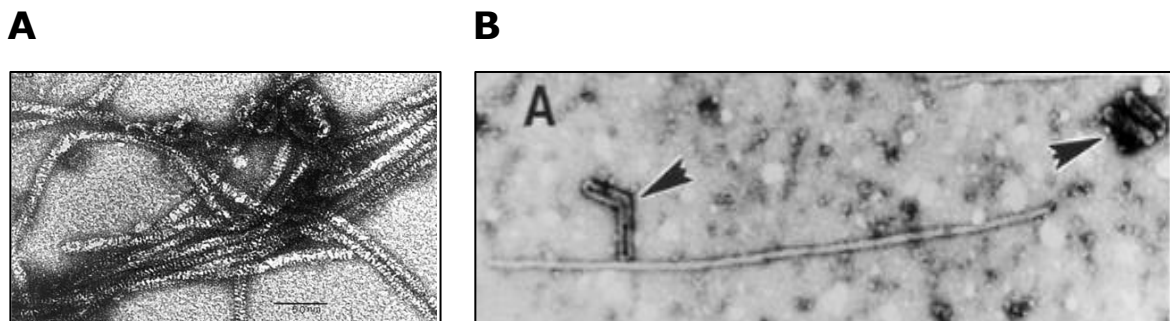


Figure 36 : Particules virales de (A) PMWaV2 et de (B) PMWaV2 et PBCOV, observées au microscope électronique à transmission dans des plants présentant des symptômes de MWD. Les particules de PBCOV sont indiquées par des flèches. (Gunasinghe et German, 1989 ; Sether et Hu, 2002)

Des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre des isolats du PCV provenant d'Australie et d'Hawaï (Hu *et al.*, 1996; Ullman *et al.*, 1989; Wakman *et al.*, 1995) ont permis la détection sérologique de PCV dans des plants d'ananas en provenance d'Australie, de France, de Malaisie et de Taïwan (Wakman, 1994), et dans des cochenilles prélevées sur des plants symptomatiques (Hu *et al.*, 1996). Deux sérotypes différents de PCV ont été caractérisés en Australie et à Hawaï, sur la base de l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Wakman *et al.*, 1995) et monoclonaux (Hu *et al.*, 1996). En raison de son association avec les cochenilles, le PCV a été renommé '*pineapple mealybug wilt-associated virus*' (PMWaV) (Hu *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1996). Il s'agit en fait d'un complexe de plusieurs virus du genre *Ampelovirus* (Karasev, 2000). Par la suite, des particules bacilliformes (**Figure 36 B**) ont été observées en co-infection avec les PMWaV dans des extraits d'ananas symptomatiques provenant d'Hawaï et d'Australie (Wakman *et al.*, 1995).

Une **première hypothèse**, émise par Carter, suggère que les symptômes de la MWD sont associés à un relargage de **phytotoxines** par la plante lors des attaques de **cochenilles** (Carter, 1933; Carter, 1935, 1945a, b; Carter and Collins, 1947; Illingworth, 1931). Puis Ito a proposé la présence d'un facteur latent comme cause de la maladie (Ito, 1959). La transmission de la maladie par un vecteur de type insecte a ensuite été observée à partir de plantes infectées, incluant des pieds mères et des plantes issues de multiplication végétative (Carter, 1963). Carter a également confirmé que la maladie était causée par un agent transmissible, probablement un virus, et proposé que les cochenilles, en plus d'être vectrices du pathogène, jouent un rôle dans le développement de la MWD, en rendant la plante plus sensible à la maladie, de par le stress causé par l'alimentation de ces insectes phytophages.

Des virus appartenant aux familles *Closteroviridae* (genre *Ampelovirus*) (Gunasinghe and German, 1986; Hu *et al.*, 1992; Thomson *et al.*, 1996; Wakman, 1994), et *Caulimoviridae* (genre *Badnavirus*) (Sether and Hu, 2002a; Wakman, 1994) ont été identifiés dans des plants d'ananas symptomatiques. L'utilisation d'outils de diagnostic moléculaire a permis de démontrer que ces plants symptomatiques présentaient des taux d'infection par les PMWaV plus élevés que les plants asymptomatiques (Hu *et al.*, 1997).

Deux hypothèses ont été émises dans la littérature pour expliquer l'étiologie de la MWD:

1) Le PMWaV2 serait le principal virus responsable de la maladie lorsqu'il est associé à des infestations de cochenilles (Hu *et al.*, 1997; Sether and Hu, 2002a; Sether *et al.*, 2001). Des travaux réalisés à Hawaï ont en effet montré une corrélation entre l'infection par le PMWaV2, l'alimentation active de la cochenille et les symptômes de la MWD, et suggéré qu'une composante liée à l'insecte, voire à un microbe endogène présent dans l'insecte, est introduite dans la plante en même temps que le PMWaV2 lors de l'alimentation des cochenilles (Dey *et al.*, 2018).

Cependant, beaucoup des travaux qui étayaient cette hypothèse ne permettent pas d'exclure l'implication d'autres agents viraux connus (autres PMWaV, badnavirus, sadwavirus) ou encore non caractérisés. Par ailleurs, des accessions asymptomatiques de la collection de variétés d'ananas maintenue par le centre de ressources génétiques de plantes tropicales de l'*United States department of Agriculture* (USDA) à Hawaï sont devenues symptomatiques en présence de cochenilles infectées par le PMWaV1, ce qui soulève la possibilité que ce virus soit lui aussi capable de causer la maladie (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005a).

2) Des combinaisons variables d'ampelovirus ou d'autres virus comme les badnavirus seraient impliqués dans les symptômes de la MWD.

L'étude en **Australie** de plusieurs parcelles expérimentales du cultivar 'Cayenne lisse' n'a pas permis d'établir de corrélation simple entre la présence de PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 et/ou PMWaV5 et la présence de symptômes de MWD (Gambley *et al.*, 2008b). Elle suggère que plusieurs combinaisons de PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 en situation de co-infection sont susceptibles de provoquer des symptômes de MWD. Et que dans trois des quatre champs, **PMWaV1** et **PMWaV3** étaient les espèces les plus fortement **associées à la maladie**, et ce en l'**absence de colonies de cochenilles**. D'autres études ont montré que même en l'absence de symptômes, l'infection par le PMWaV1 était associée à des réductions de rendement de 5 à 15% (Sether and Hu, 2001, 2002b). Actuellement, aucune étude n'a été réalisée pour étudier l'implication du PMWaV5 et du PMWaV6 dans l'apparition des symptômes de MWD (Larrea *et al.*, 2022).

Plusieurs travaux ont montré que les badnavirus ne sont pas la cause première de la MWD (Gambley *et al.*, 2008a; Sether and Hu, 2002a; Thomson *et al.*, 1996). Enfin, le rôle éventuel dans la MWD des sécovirus récemment caractérisés n'est pas documenté (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b).

Les co-infections ou infections mixtes (*i.e.* infections simultanées par plusieurs virus chez le même hôte) sont courantes dans la nature, et peuvent avoir un impact sur la capacité d'adaptation dans la plante hôte des virus impliqués (Maclot *et al.*, 2021). Dans la littérature, des interactions synergiques ont été démontrées en situation de co-infection entre des virus non apparentés ou apparentés. Elles ont un effet facilitateur sur l'un ou les deux partenaires viraux, augmentant la réplication du ou des virus, ou induisant des symptômes plus graves de l'un ou plusieurs des virus impliqués considéré(s) individuellement (Hibino, 1983; Syller, 2012; Wintermantel *et al.*, 2018). De même, des données suggèrent que les badnavirus pourraient avoir un effet synergique avec les PMWaV dans le développement de la MWD (Gambley *et al.*, 2008a). Cependant, seule la vérification du postulat de Koch permettrait d'établir le lien causal avec un ou des virus spécifiques. L'absence de concordances entre les résultats des travaux menés à Hawaï et en Australie sur l'étiologie de la MWD souligne l'importance de clarifier le rôle des virus infectant l'ananas dans la MWD (Gambley and Thomas, 2015).

5.4.2 Rôle des cochenilles farineuses dans la MWD

- **Espèces impliquées**

Les espèces *Dysmicoccus brevipes* ou 'cochenille rose de l'ananas' (qui provoque des taches vertes) (Carter, 1932, 1933; Carter, 1947), et *Dysmicoccus neobrevipes*, ou 'cochenille grise de l'ananas', sont associées à la MWD (**Figure 14 A et B**) (Beardsley, 1959).



Figure 37 : Cochenille potentiellement impliquée dans la MWD : *Pseudococcus longispinus*.
(Source : Cappaert C)

Une autre espèce de cochenille, *Pseudococcus longispinus*, (**Figure 37**) est parfois observée dans les champs d'ananas, et a également été associée à la MWD par certains auteurs (German *et al.*, 1992). Toutefois, les expériences menées par (Carter, 1967) n'ont pas permis de montrer une association claire de cette espèce avec la MWD sur le terrain, alors qu'elle est capable d'induire des symptômes en laboratoire (Petty, 1978).

- Aires de répartition et biologie

D. brevipes et *D. neobrevipes* sont présentes dans toutes les régions productrices d'ananas, y compris La Réunion (Ben-Dov, 1994) où est également présente *P. longispinus* (Anses, 2015). *D. neobrevipes* et *D. brevipes* diffèrent en termes de biologie (morphologie et reproduction), de préférences d'hôtes, de comportements alimentaires et de symbiotes internes associés (Beardsley, 1959; Carter, 1935, 1967; Ito, 1938). *D. neobrevipes* se nourrit généralement sur les parties aériennes de l'ananas, y compris les fruits et les fleurs, et parfois à l'intérieur des fleurs (Beardsley, 1959; Jahn, 1993), alors que *D. brevipes* se nourrit généralement à la base des feuilles, des tiges, des racines et des couronnes, parfois même sous terre (Beardsley, 1959; McKenzie, 1967). La durée de vie de *D. neobrevipes* varie de 78 à 111 jours, avec quatre stades larvaires dont les deux premiers se nourrissent activement. En comparaison, *D. brevipes* a une durée de vie de 59 à 117 jours (Ito, 1938).

La plupart des cochenilles farineuses se rassemblent en colonies sur les jeunes plantes tendres et se nourrissent des feuilles centrales. Elles colonisent les fruits et leurs couronnes (Carter, 1932). Une fois établies, leurs populations se

développent rapidement en raison de la protection que leur procure leur abri contre les prédateurs. Dans les stades avancés de la MWD, les colonies de cochenilles abandonnent les plants d'ananas car la sécrétion de miellat sur les plantes mourantes est réduite ainsi que le nombre de fourmis s'occupant des colonies (Carter, 1932).

- **Gammes d'hôtes**

D. neobrevipes semble avoir une gamme d'hôtes limitée (Dey *et al.*, 2018), alors que *D. brevipes* semble très polyphage, avec une gamme d'hôtes très large appartenant à plus de 100 genres placés dans 53 familles botaniques (Ben-Dov, 1994). Cette espèce est particulièrement commune sur ananas mais également sur des cultures fruitières et des plantes ornementales.

- **Mode de dispersion**

Les nymphes de premier stade de *D. neobrevipes*, ou '*crawlers*', rampent vers le haut des feuilles et peuvent être dispersées par le vent (Jahn and Beardsley, 2000). Elles sont considérées comme le stade le plus mobile des cochenilles et peuvent facilement se déplacer d'une plante à une autre et établir de nouvelles colonies. Des fourmis ont été observées en train d'aider les cochenilles à coloniser de nouvelles plantes en les portant dans leurs mandibules, favorisant leur dispersion dans et entre les champs (Phillips, 1934).

- **Rôle dans la MWD**

Les premières études réalisées par Carter (1933, 1935) attribuaient la cause du flétrissement aux toxines libérées par les cochenilles lors de leur prise alimentaire, qu'elles réalisent en insérant leurs stylets dans les tissus de la plante et en extrayant la sève élaborée, ce qui peut entraîner une décoloration, une déformation et, dans les cas graves, une mort prématurée de la plante hôte. Une relation directe entre l'incidence de la MWD et les fortes infestations de cochenilles farineuses susceptibles de transmettre les PMWaV a été démontrée par Sether (Sether and Hu, 2002a, b). Puis l'association constante des cochenilles avec la maladie a conduit à l'appellation de '*mealybug wilt*' (Rohrbach and Johnson, 2003). Après que les cochenilles se sont nourries, les symptômes mettent six à huit mois à se développer et apparaissent plus rapidement sur les plantes jeunes (Sether and Hu, 2002a). L'intensité des symptômes dépend de différents facteurs tels que

la variété et l'âge de la plante, le nombre d'individus dans la population de cochenilles, la durée de l'alimentation et les conditions climatiques telles que la température, les températures élevées favorisant le développement de la maladie (Sether and Hu, 2002a).

- **Lutte biologique**

Les ennemis naturels de *D. brevipes* et *D. neobrevipes* décrits actuellement comprennent le parasitoïde *Anagyrus ananatis* (Hymenoptera : Encyrtidae) et les prédateurs *Nephus bilucernarius* Mulsant (Coleoptera : Coccinellidae) et *Lobodiplosis pseudococci* (Diptera : Cecidomyiidae) (González-Hernández *et al.*, 1999). Ces prédateurs ont été introduits à Hawaï comme agents de biocontrôle et ont eu un effet significatif sur les populations de *D. brevipes*, mais seulement en l'absence de la fourmi *P. megacephala* (González-Hernández *et al.*, 1999).

- **Lutte chimique**

Actuellement, trois spécialités sont homologuées en France pour lutter contre les cochenilles sur ananas, avec pour matière active la spirotetramate, la maltodextrine, et l'huile essentielle d'orange. Des études sont également en cours sur l'utilisation de l'huile de neem. En revanche, aucune spécialité n'est autorisée pour lutter contre les fourmis (E-Phy).

5.4.3 Rôle des fourmis dans la MWD

Carter (1960) a été le premier à observer une corrélation entre la présence de fourmis, de cochenilles et la MWD. Plus tard, une corrélation positive a été établie entre le niveau d'infestation en fourmis et le pourcentage de plants d'ananas infestés par les cochenilles (Rohrbach *et al.*, 1988), dont l'action peut conduire à une augmentation des populations de cochenilles et donc à une sévérité plus grande de la maladie (Jahn *et al.*, 2003). Les espèces de fourmis les plus communément associées aux cochenilles de l'ananas dans le monde appartiennent aux genres *Pheidole* et *Solenopsis* (Dey *et al.*, 2018) et sont présentes à La Réunion (Global Invasive Species Database, 2023; Gotzek *et al.*, 2015).

Sur le terrain, les fourmis jouent un rôle clé dans la **dispersion des cochenilles** farineuses à partir d'hôtes alternatifs ou de résidus de culture d'ananas vers des plantations d'ananas plus récentes. Il existe une relation mutualiste entre les fourmis, qui offrent une protection aux cochenilles contre leurs ennemis naturels, et les cochenilles, qui offrent en échange leur miellat riche en acides aminés et en sucres sécrétés. Cette relation est commune à de nombreuses espèces de fourmis (Jahn, 1992).

La lutte contre les fourmis qui contribuent au développement des colonies de cochenilles est le principal moyen de contrôle de la MWD (Rohrbach and Schmitt, 2003). A Hawaï, il a été démontré que si les fourmis sont contrôlées, les prédateurs maintiennent les cochenilles farineuses en effectif limité (Rohrbach *et al.*, 2003).

5.4.4 Rôle des supresseurs d'ARN *silencing* dans l'étiologie de la MWD

L'**ARN *silencing*** est l'un des mécanismes de défense antiviral des eucaryotes, notamment des plantes (Lopez-Gomollon and Baulcombe, 2022). Il est basé sur la dégradation séquence-spécifique des ARN génomiques et/ou des transcrits d'origine virale. Il a été découvert et largement étudié chez les plantes (Hamilton and Baulcombe, 1999; Lopez-Gomollon and Baulcombe, 2022; Voinnet, 2001). Le génome de certains virus code des supresseurs de *silencing* (Voinnet, 2001; Xie and Guo, 2006) leur permettant d'échapper aux défenses antivirales basées sur l'ARN *silencing* de l'hôte. Plusieurs des **protéines** codées par le génome du **PMWaV2** sont des **suppresseurs** locaux (CP, p20) et/ou systémiques (CP, p20, CPd, p22) de *silencing* (**Figure 38 B**), ce qui suggère qu'une stratégie de suppression du *silencing* pourrait être employée par ce virus pour échapper aux défenses de son hôte (Dey *et al.*, 2015) et favoriser son maintien dans les plantes infectées.

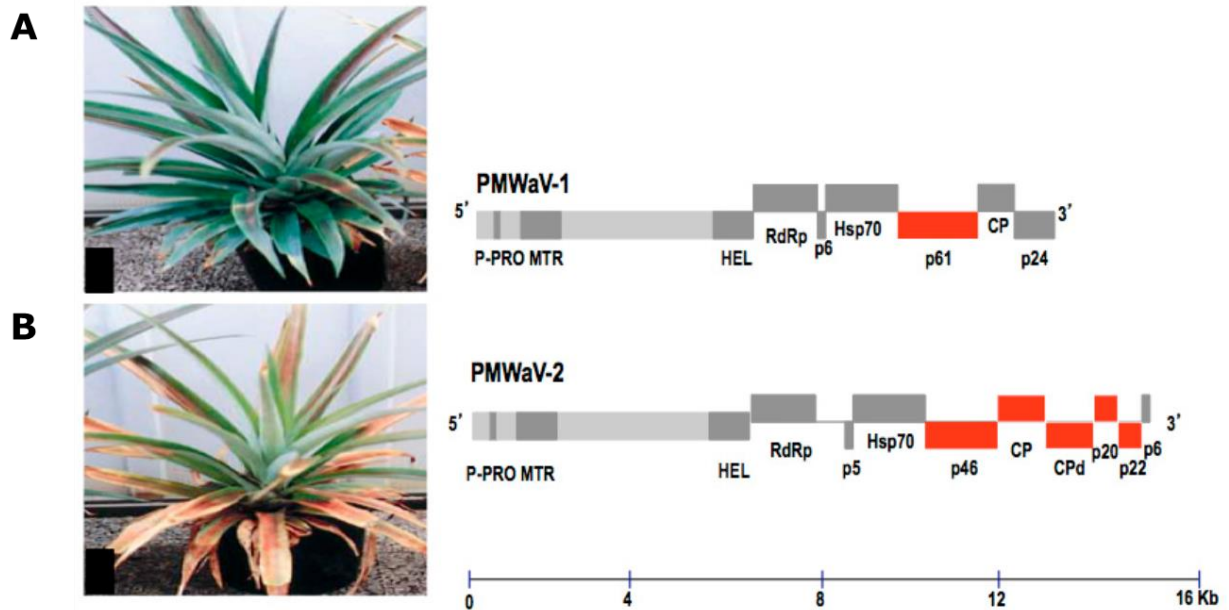


Figure 38 : Plant d'ananas (A) asymptotique infecté par le PMWaV1, et organisation de son génome, (B) symptomatique infecté par le PMWaV2, présentant des symptômes de flétrissement typiques, et organisation de son génome. Les boîtes représentent les cadres ouverts de lecture et les boîtes rouges représentent les ORF qui codent pour des suppresseurs d'ARN silencing. (Dey et al., 2018).

L'**absence** des gènes orthologues codant pour les protéines p20 et p22 dans les génomes de **PMWaV1** (Figure 38 A) et **PMWaV3** par rapport au PMWaV2 pourrait en partie **expliquer** les **différences** dans la manifestation des **symptômes** de la MWD (Dey *et al.*, 2015; Sether *et al.*, 2009). De plus, les différents suppresseurs de *silencing* codés par les génomes de PMWaV2 et PMWaV1 pourraient expliquer comment les virus qui affectent des cultures pérennes telles que l'ananas ont tendance à provoquer des infections virales persistantes, mais qui sont rarement létales pour l'hôte (Dey *et al.*, 2018).

5.4.5 Le phénomène de rémission naturelle

Le phénomène de **rémission** naturelle (*recovery*) de plantes infectées par un virus a été décrit chez plusieurs plantes à multiplication végétative dont la patate douce (Gasura *et al.*, 2008; Gasura and Mukasa, 2010) et le manioc (Fondong *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001). Chez l'ananas, sous certaines conditions, il a été observé que les symptômes foliaires de MWD disparaissent au niveau des nouvelles feuilles en développement (Carter, 1944; Carter, 1963).

Gambley (2008) a émis l'hypothèse que la capture des siRNA endogènes de l'ananas, par des suppresseurs de *silencing* non spécifiques, jouerait un rôle dans les symptômes de la MWD, en perturbant les fonctions cellulaires normales et le développement de la plante, tels que la synthèse d'anthocyanes et la croissance des racines. En conditions expérimentales, l'apparition des symptômes de la MWD peut intervenir entre 2 et 6 mois après inoculation par des cochenilles virulifères (Sether and Hu, 2002a; Sether *et al.*, 2005a). Selon Gambley (2008), cette période de latence serait nécessaire à l'accumulation de suffisamment de suppresseurs pour perturber le processus naturel de *silencing* de la plante et produire des symptômes visibles. La durée de cette période de latence peut être influencée par divers facteurs, tels que le nombre d'espèces d'*Ampelovirus* présentes, ou la charge totale d'espèces virales individuelles introduites dans la plante par les cochenilles lors de l'alimentation, mais aussi l'âge physiologique ou le taux de croissance de la plante (Carter, 1945a). Au fil du temps, la plante entrerait dans un 'état stable' de régulation dans lequel le niveau des protéines suppressives ne dépasserait pas le seuil requis pour supprimer la production de siRNA, conduisant à un phénotype de rémission (Gambley, 2008). La plante deviendrait alors asymptomatique mais resterait virosée. Là encore, plusieurs facteurs, comme l'âge de la plante, le nombre de cochenilles présentes et la quantité de virus peuvent influencer le phénomène de rémission (Sether and Hu, 2002a).

Grâce à l'**alternance de phases de maladie** et de **rémission**, la MWD est rarement létale, ce qui permet des infections persistantes. Cependant, les plantes qui se rétablissent ne sont **pas immunisées** contre de nouvelles infections virales (Carter, 1963; Ito, 1959), notamment si elles sont réinfectées par un virus hétérologue (Ito, 1959).

5.4.6 MWD : maladie ou syndrome ?

Une maladie est définie comme un état phénotypique anormal qui présente des écarts, appelés symptômes, par rapport au phénotype normal attendu. Calvo *et al.*, (2003) la décrit comme un état dans lequel on peut associer un **agent pathogène** à un type de **symptôme précis**. Il oppose cette notion au concept de **syndrome** qui correspondrait à la présence de **symptômes variables** dont les **causes** et les processus ne sont **pas clairement définis**. Dans ce cas, les symptômes ne sont pas forcément liés à un agent pathogène. D'**autres facteurs**,

biotiques et abiotiques, peuvent générer ou accentuer ces symptômes. La différence entre un syndrome viral et une maladie virale réside dans le degré de spécificité et de complexité. Un syndrome viral décrit des symptômes généraux observés chez les plantes infectées par différents virus, tandis qu'une maladie virale se réfère à une condition spécifique causée par un ou plusieurs virus identifiés (Calvo *et al.*, 2003).

Dans le cas de la MWD, le ou les agent(s) causal(-aux) ne sont toujours pas clairement identifiés et les symptômes qui lui sont associés demeurent assez généraux, ce qui peut conduire à des confusions avec des symptômes causés par d'autres facteurs que l'infection virale. Par conséquent, considérer la MWD comme un syndrome est une hypothèse que nous ne pouvons pas ignorer.

5.5 La MWD à La Réunion

En 2014, la filière ananas réunionnaise a été confrontée à une **baisse drastique** et généralisée du **rendement** et de la qualité des fruits sur le cultivar '*Queen Victoria*'. Afin d'en connaître l'origine, le CIRAD a mandaté, entre 2014 et 2015, différents experts en agronomie pour réaliser un état sanitaire général et complet sur 16 parcelles situées dans les zones de production de l'île. En parallèle, un groupe de travail 'Émergence de la maladie du *wilt*' a été constitué. Il regroupait des partenaires du CIRAD, de l'ARMEFLHOR, de la Chambre d'Agriculture, de la FDGDON et de la DAAF. Ses conclusions sont résumées ci-dessous.

Au vu de la symptomatologie observée sur les parcelles examinées, l'hypothèse de la présence de la MWD a été envisagée comme cause possible, mais un diagnostic plus poussé a ensuite été réalisé pour évaluer le rôle potentiel de ravageurs. La présence systématique de symphytes (myriapodes parasites des racines) a été observée, avec des densités importantes dans toutes les parcelles examinées, quelle que soit la zone géographique de l'île et que les symptômes de la MWD soient ou non présents (Groupe de travail collaboratif, 2015). De même, les principales espèces de nématodes connues pour provoquer des lésions du système racinaire de l'ananas, *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus* et *Meloidogyne sp.*, ont été mises en évidence dans toutes les parcelles analysées. La présence de symphytes et de nématodes peut être considérée comme un facteur aggravant dans l'apparition de symptômes similaires à la MWD (rougissement, dessèchement, flétrissement et jaunissement), dans la mesure où la nutrition des

plants infestés est perturbée, mais pas comme un facteur causal. De plus, une forte infestation de cochenilles (*D. brevipes* et *D. neobrevipes*) a été observée sur les plants symptomatiques, associée à la présence de fourmis.

D'autre part, les membres de ce groupe de travail ont tenté d'identifier les causes agronomiques, climatiques et épidémiologiques associées à l'expression des symptômes de la MWD (Groupe de travail collaboratif, 2015). Si aucune cause particulière n'a pu être clairement associée à l'expression des symptômes, certains facteurs semblent la favoriser : les températures basses (effet saison-hiver), la sécheresse, l'absence de rotation des cultures, une forte pression de cochenilles et fourmis, un délai court de replantation (moins de six mois) et une faible fréquence de fertilisation. En effet, il semble que des apports réguliers d'engrais permettent aux plants, mêmes s'ils sont symptomatiques, de mieux résister à la maladie, et d'être maintenus en production. En parallèle, des analyses moléculaires réalisées sur 21 plants ont permis la détection de deux ampelovirus (**PMWaV1**, **PMWaV2**) et d'un badnavirus (**PBCOV**), **même sur les plants asymptomatiques** (Groupe de travail collaboratif, 2015).

Depuis, aucune autre enquête conséquente de terrain, associée à une étude de la présence, de la prévalence et de l'incidence des virus potentiellement impliqués dans la MWD n'a été réalisée à La Réunion.

5.6 Gestion et contrôle de la MWD

La gestion de la MWD reste difficile en raison de la complexité de l'étiologie et de l'épidémiologie de la maladie, et de l'utilisation quasi générale de matériel de plantation non certifié. Pourtant, des changements de pratiques peuvent contribuer à réduire considérablement l'incidence du virus.

Aussi, il est crucial d'éliminer les **réservoirs viraux** tels que les résidus des anciennes parcelles infectées situées à proximité des nouvelles plantations après la récolte (Sether and Hu, 2002a). Ces résidus doivent être détruits par broyage fin, car ils peuvent servir d'hôtes aux cochenilles (Fournier *et al.*, 2015; Py *et al.*, 1984). La gestion de la taille des plantations, l'instauration de périodes de jachère entre les cycles de culture, et l'utilisation de systèmes d'irrigation appropriés peuvent également contribuer au contrôle de la MWD (Hu *et al.*, 1997; Sether *et al.*, 1998).

La lutte chimique contre les cochenilles et les fourmis, quand elle existe, peut être une méthode efficace pour contrôler les maladies (Rohrbach and Johnson, 2003), même si la préférence de *D. brevipes* pour les fissures formées dans les fruits, peut réduire considérablement l'efficacité des insecticides de contact (Sether *et al.*, 1998).

Le traitement des rejets par trempage dans des insecticides s'est avéré efficace pour le contrôle pré-plantation des cochenilles. De plus, les applications d'insecticides systémiques ou de contact sont très efficaces pour les éliminer, sauf lorsqu'elles infestent l'intérieur des couronnes, des fleurs ou des fruits (Jahn, 1993; Sether *et al.*, 1998). Les appâts insecticides sont considérés comme le moyen le plus courant et efficace pour lutter contre les fourmis (Hughes *et al.*, 2002), mais beaucoup de molécules insecticides sont désormais interdites en France et dans le reste de l'Union Européenne. Aussi, des solutions de lutte naturelles, telles que la lutte biologique, sont-elles recherchées. Par exemple, plusieurs ennemis naturels potentiels des cochenilles ont été introduits à Hawaï, mais aucun n'a permis de contrôler efficacement les cochenilles en présence de fourmis (Carter, 1967; Rohrbach *et al.*, 1988). La recherche d'ennemis naturels des fourmis (bactéries et champignons entomopathogènes) s'est principalement concentrée sur la lutte contre les espèces de *Solenopsis*. Cependant, les potentiels candidats sont rares en raison des sécrétions exocrines antibiotiques produites par les fourmis, qui limitent l'action des pathogènes (Jouvenaz *et al.*, 1981).

La création de variétés **tolérantes** ou **résistantes** par amélioration génétique est une stratégie possible, qui n'a pas encore donné de résultats exploitables. La création variétale conventionnelle se heurte à des problèmes de stérilité, notamment pour la variété 'Cayenne lisse' (d'Eeckenbrugge *et al.*, 2011). Des approches transgéniques sont également possibles par transformation avec la création d'un ananas résistant au 'Black Heart' (Ko *et al.*, 2006), mais elles n'ont pas donné de résultats probants pour le contrôle de la MWD (Perez *et al.*, 2006). Aucune variété ou cultivar résistant au PMWaV1 n'a été identifiée. La résistance des plantes vis-à-vis du PMWaV2 et 3 n'a pas été évaluée.

5.7 La culture *in vitro* de l'ananas : vers un assainissement du matériel végétal

La culture *in vitro* (CIV) est une technique de micropropagation de matériel végétal utilisée pour la multiplication rapide et à grande échelle de différentes espèces végétales (Dewald *et al.*, 1988; Yapo *et al.*, 2011). Seule ou associée à la thermothérapie, à la chimiothérapie ou à la culture de méristème, la CIV permet d'assainir des ressources génétiques d'intérêt vis-à-vis de virus. Elle est particulièrement appropriée pour les plantes à multiplication végétative comme l'ananas, pour lesquelles le recours à la reproduction sexuée, qui permet un assainissement naturel contre la plupart des virus qui ne sont pas transmissibles par la graine (Johansen *et al.*, 2003), n'est pas envisageable. Pour l'ananas, l'approche la plus courante consiste à mettre en culture sur milieu solide les bourgeons axillaires, qui contiennent des méristèmes, prélevés sur les tiges de couronnes ou de plants pour régénérer de petits plants qui peuvent à leur tour fournir des bourgeons axillaires utilisés pour une micropropagation de masse (**Figure 39 A et B**). Cette approche a permis d'assainir des accessions d'ananas vis-à-vis du PMWaV1 (Sether *et al.*, 2001).

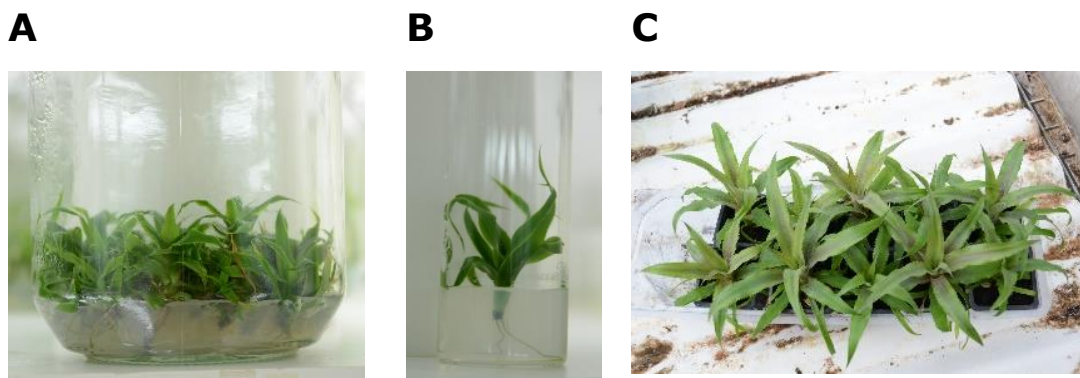


Figure 39 : Étapes de la micropropagation d'ananas : (A) multiplication, (B) isolement, et (C) acclimatation en serre. (Source D. Massé)

Les **coûts de production** de plants issus de CIV sont toutefois élevés, ce qui freine leur adoption, notamment par les producteurs d'ananas dans les DOM. De plus, la CIV peut induire des variations somaclonales induisant des modifications phénotypiques telles que des feuilles épineuses, ou la croissance de bulbilles à la base des fruits induisant des déformations (Yapo *et al.*, 2011). Comme toutes les techniques de multiplication végétative, la CIV peut conduire à la **propagation**

des virus à la descendance si le matériel végétal de départ est infecté. En conséquence, la CIV est généralement associée à de stricts processus de contrôle qualité ou de certification visant à garantir l'état sanitaire du matériel multiplié. Dans le cas de l'ananas, le processus complet d'assainissement demande environ six mois et la durée totale d'un cycle de multiplication permettant de produire plusieurs milliers de plants est d'un peu moins de trois ans, ce qui est plus rapide que les techniques de propagation horticoles plus classiques comme l'amplification à partir de vieilles souches de plants ou par écoeurage de plants en début de floraison. Enfin, ce processus permet d'apporter une garantie sur l'état sanitaire de bien meilleur niveau que les techniques classiques.

6 – Problématiques scientifiques et objectifs de travail

A La Réunion, la culture de l'ananas est en forte expansion mais ne pourra répondre à la demande de la filière export que par une extension substantielle des surfaces cultivées. Cependant, la méconnaissance de l'étiologie, de la prévalence et de la symptomatologie de la MWD est un obstacle à cette augmentation car elle limite notre capacité à mettre en place des stratégies de lutte et de gestion adaptées à cette maladie, basées sur un diagnostic fiable.

Dans ce contexte, la première partie du travail rapporté dans cette thèse porte sur la **situation réunionnaise** vis-à-vis de la **MWD**, et sur sa **symptomatologie**. Elle a pour objectif de répondre à des questions clés sur la situation virale de l'ananas à la Réunion :

- 1)** Quelles sont la **prévalence** et la **co-occurrence** des différents virus dans l'ensemble des zones de cultures d'ananas à La Réunion ?
- 2)** Peut-on **associer** un ou plusieurs types de **symptômes** liés à la MWD à un virus ou à un **cortège viral**, selon les deux hypothèses décrites dans la littérature ?
- 3)** La MWD est-elle une **maladie virale ou multifactorielle** associant virus, ravageurs, stress abiotiques et phénomène de récupération ?
- 4)** L'utilisation de plants issus de **vitroplants** peut-elle constituer une solution efficace pour lutter contre la MWD ? Quelle est la dynamique de **contamination** au champ de ces VP d'ananas ?

Pour répondre à ces questions, un état sanitaire de la filière ananas d'une ampleur inédite a tout d'abord été réalisé *via* une **enquête** de terrain portant sur **450 échantillons** (**Chapitre 2**). Pour cela, un diagnostic moléculaire **avec a priori**, ciblant trois ampelovirus (**Article 1**) et deux badnavirus potentiellement impliqués dans la MWD a été conçu et mis en œuvre. Grâce à l'analyse statistique des données recueillies lors de l'enquête, il a été possible d'étudier la **diversité des populations virales**, leur **répartition géographique** à l'échelle réunionnaise, leur relation avec l'**expression de la MWD** (pathobiome), et leur dynamique de contamination dans des plants issus de **vitroplants** (**Article 2**).

De plus, la découverte régulière de nouveaux virus infectant l'ananas conduit à l'abandon progressif des outils de détection spécifiques, peu adaptés au multiplexage, au profit d'approches de **diagnostic métagénomique** plus puissantes, qui permettent de surcroît d'explorer la **diversité virale** de l'ananas. La deuxième partie de ma thèse porte sur l'évaluation de l'efficacité d'approches de métagénomique pour diagnostiquer les infections multiples de l'ananas à La Réunion. Elle a pour objectif de répondre à des questions méthodologiques et scientifiques :

- 1)** Quelle(s) **approche(s) de séquençage haut débit** (HTS) permettrai(en)t de **détecter** et/ou de **caractériser** le virome de l'ananas à La Réunion ?
- 2)** Quel est l'apport des approches de séquençage haut débit de **deuxième** et **troisième générations** pour le diagnostic viral ?
- 3)** Quelle est la **diversité génétique** des virus infectant l'ananas à La Réunion ? Quelles sont les **relations phylogéniques** avec les autres isolats de ces virus présents dans le monde ?

Pour répondre à ces interrogations, nous avons conçu et évalué deux approches de diagnostic **sans a priori**, basées sur le **séquençage HTS** de deuxième et troisième générations (**Chapitre 3**), pour **détecter** de manière **exhaustive** la présence de virus (**Article 3** et **Article 4**) dans le cadre de la surveillance sanitaire des plantations et des **plantes mères** destinées à la production de vitroplants garantis indemnes de virus.

Chapitre 2

La maladie du 'wilt' à La Réunion



*Parcelle d'ananas à La Réunion (2020)
(Source Delphine Massé)*

En 2014, la filière ananas réunionnaise a été confrontée à l'apparition de symptômes de dessèchements et de dépérissements des plants, entraînant une diminution du rendement et de la qualité des fruits. Au vu de la symptomatologie observée, et de la présence de cochenilles sur des plants symptomatiques, l'hypothèse de la maladie du '**Mealybug wilt disease of pineapple**' (MWD) a été évoquée. La MWD est décrite comme une **maladie complexe** en raison de la variabilité des **symptômes** foliaires qui y sont associés dans la littérature (rougissement, jaunissement, flétrissement, dessèchement, incurvation des feuilles), mais aussi en raison de l'importante diversité des **virus** potentiellement impliqués.

En effet, le cortège de virus responsables des symptômes de la MWD n'est pas clairement identifié à ce jour. A Hawaï, des études ont montré que les symptômes de la MWD seraient dus à la présence simultanée de virus appartenant au genre **Ampelovirus** de la famille des *Closteroviridae*, notamment le pineapple mealybug wilt-associated virus 2 (PMWaV2), et des cochenilles (Sether and Hu, 2002), alors qu'en Australie, ce sont les PMWaV1 et PMWaV3, voir d'autres ampelovirus, en co-infection ou non, qui ont été associés à la maladie (Gambley *et al.*, 2008b; Sether *et al.*, 2005). L'étude de Gambley met également en évidence la possibilité que des virus autres que ceux du genre *Ampelovirus* aient un rôle synergique dans l'expression de la maladie. Ainsi le pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) et le pineapple bacilliform ER virus (PBERV), appartenant à la famille des **Badnavirus**, ont été suspectés de jouer ce rôle (Gambley *et al.*, 2008a; Sether *et al.*, 2012).

L'expression de la maladie elle-même est aussi sujette à discussion, et il peut être difficile d'identifier clairement un plant, ou une parcelle touchée. En effet, les symptômes généralement associés à la MWD présentent des similarités avec ceux provoqués par d'**autres ravageurs** tels que des nématodes (jaunissement) (Rohrbach and Johnson, 2003), ou des symphytes (rougissement) (Py *et al.*, 1984). Ils peuvent aussi résulter de **désordres physiologiques** comme des carences minérales en azote et en soufre (jaunissement), en phosphore et en potassium (dessèchement), en magnésium et en fer (jaunissement, dessèchement) (Py *et al.*, 1984). Ils peuvent également être confondus avec les effets d'un épisode de sécheresse ou au contraire d'un excès d'eau (jaunissement, rougissement, enroulement) (Carter, 1945; Malézieux *et al.*, 2003), ou encore d'une luminosité trop importante (Py *et al.*, 1984). Enfin, l'utilisation de

traitements pour l'induction de la floraison (**TIF**), qui permet de synchroniser la floraison des plants d'ananas par application d'éthylène, est là encore connue pour provoquer des réactions s'apparentant à la MWD (rougissement) (Saltveit, 1999).

A La Réunion, des suites de la remontée croissante de description de la maladie au champ, des analyses préliminaires de recherche de virus ont conduit à la première détection de deux ampelovirus (PMWaV1, PMWaV2) et un badnavirus (PBCOV), même sur des plants asymptomatiques. Si ces virus sont transmis horizontalement par cochenille, la maladie se propage largement par l'utilisation de **rejets** de la culture précédente (Sastry, 2013). En conséquence, afin d'assainir la culture d'ananas à La Réunion, l'utilisation de **vitroplants** (VP) d'ananas, exempts de virus (Sether *et al.*, 2001; Umber *et al.*, 2020) a été récemment testée sans que l'effet réel de cette pratique sur la contamination ultérieure n'ait été évalué.

Dans ce contexte, il était tout d'abord essentiel de mieux comprendre l'étiologie de cette maladie complexe, pour ensuite évaluer si l'utilisation de VP pouvait être une solution pour améliorer globalement l'état sanitaire des cultures d'ananas à La Réunion. Le **chapitre 2** de cette thèse, présenté essentiellement sous la forme de l'**Article 2** ci-dessous, a donc consisté à **(i)** évaluer l'**état sanitaire** des plantations d'ananas à La Réunion, **(ii)** déterminer la **distribution** et la **prévalence** des principaux virus, affectant le cultivar '*Queen Victoria*', **(iii)** analyser leur possible **association avec les symptômes** typiques de la MWD ; et enfin ; **(iv)** évaluer l'impact de l'utilisation de **VP** sur la prévalence des virus.

Entre septembre et octobre 2020, une **enquête** collaborative a été réalisée portant sur quinze parcelles d'ananas du cultivar '*Queen Victoria*', représentatives des zones de production de l'île de La Réunion. Parmi ces quinze parcelles, deux étaient plantées avec des rejets provenant de VP, les autres parcelles étant issues de rejets des cultures précédentes (appelés 'rejets traditionnels'). Pour chaque parcelle, 30 plants ont été prélevés donnant un total de **450 échantillons**. Les prélèvements étaient accompagnés d'un questionnaire portant à la fois sur l'itinéraire technique de la parcelle et sur son état sanitaire par rapport à la MWD. Les symptômes associés à la MWD ainsi que la présence de cochenille ont été notés pour chaque plant au moment de la collecte. Chaque échantillon a été indexé sur

les cinq principaux virus décrits sur ananas et potentiellement responsables de la MWD (PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PBCOV et PBERV).

L'analyse de ces 450 échantillons collectés, a permis de différencier trois principales typologies de parcelles : les parcelles issues de VP d'un côté et deux groupes de parcelles issues de rejets traditionnels, différenciés par leur itinéraire technique de l'autre. Les tests réalisés ont permis de montrer la présence des trois ampelovirus ([Article 1](#)), et d'un des deux badnavirus, le PBCOV. L'indexation a révélé que **93% des plants étaient infectés** par au moins un virus, et que la **co-infection était fréquente** (76,2%). L'ensemble des plants indemne de virus (7%) était issus de rejets de VP. Les virus les plus répandus étaient le PMWaV1 (78%) et le PBCOV (87%), ce dernier étant décrit pour la première fois à La Réunion.

La recherche d'une association entre la présence de virus et de symptômes de la MWD ([Article 2](#)) suggère que les symptômes de **rougissement ou de jaunissement** ne seraient pas attribuables à la MWD, mais pourraient avoir une **origine physiologique**. A l'opposé, les analyses ont révélé que la présence des virus **PMWaV2 et/ou PMWaV3** serait globalement associée à l'apparition des symptômes **de dessèchement et de flétrissement**, tandis que la présence de **PMWaV1** serait associée aux symptômes **d'incurvation et de flétrissement**. **Cependant, les analyses n'ont pas permis de démontrer une association stricte entre la présence de ces virus et l'apparition d'un ou plusieurs symptômes**. Cette conclusion est à mettre au regard d'une des limitations de notre étude. En effet, alors qu'aujourd'hui un large cortège de virus est décrit sur ananas, nous nous sommes limités à l'indexation de cinq de ces virus. Il est de ce fait possible qu'un ou plusieurs acteurs viraux, pouvant être associés majoritairement à la symptomatologie, n'aient pas été pris en compte. Toutefois, l'indexation par séquençage haut débit de certains échantillons présentant des symptômes évidents, mais qui se sont révélés négatifs pour la présence des cinq virus testés, suggère l'absence de biais majeurs dans l'identification virale. Cette absence de virus indique aussi qu'il est possible d'observer les **symptômes** les plus typiques de la MWD, tels que le flétrissement et l'incurvation, alors même que le **plant est 'virus-free'** ([Article 2](#)).

Bien que la relation directe entre les virus et les symptômes puisse être complexe, en raison de nombreux facteurs influençant les signes observables sur les plants

d'ananas, notre étude met en évidence une **augmentation globale des symptômes en fonction du nombre croissant d'espèces virales infectant un même plant**. En somme, alors qu'il reste difficile de réellement qualifier l'étiologie de la MWD, **l'apparition des symptômes est globalement liée à l'état sanitaire**. Dans ce contexte, la prévalence virale plus faible observée dans les parcelles issues de **VP**, qui suggère une **contamination limitée**, offre une première piste dans la lutte contre la MWD, indépendamment des virus impliqués. Ces résultats doivent être confirmés dans le temps avec l'utilisation de méthodes holistiques pour la caractérisation du virome de l'ananas. **L'utilisation de VP pourrait constituer la meilleure alternative pour assainir la culture et éviter cette accumulation de virus au fil du temps**. Il reste alors à évaluer comment cette pratique pourrait être implémentée plus globalement pour la culture de l'ananas à La Réunion.

Article 1

*First report of three pineapple mealybug wilt-associated viruses in
Queen Victoria Pineapples in Reunion Island.*

Disease Note

Diseases Caused by Viruses

First Report of Three Pineapple Mealybug Wilt-Associated Viruses in Queen Victoria Pineapples in Reunion Island

D. Massé,¹ N. Cassam,¹ B. Hostachy,¹ M.-L. Iskra-Caruana,^{2,3} M. Darnaudery,^{4,5} P. Lefeuvre^{6,7} and J.-M. Lett^{6,7,†}

¹ ANSES, Laboratoire de la santé des végétaux (LSV), Unité RAPT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

² CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

³ BGPI, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

⁴ CIRAD, UPR HortSys, F-97455 Saint-Pierre, La Réunion, France

⁵ HortSys, Université de Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

⁶ CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

⁷ PVBMT, Université de La Réunion, CIRAD, Saint-Pierre, France

Funding: Funding was provided by European Union - Conseil Régional de La Réunion (GURDT / 12016-1731-0006632). Plant Dis. 0:1, 2020; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1068-PDN>. Accepted for publication 7 October 2020.

Mealybug wilt of pineapple is one of the most destructive diseases of pineapple (*Ananas comosus*) in the world (Sether et al. 2005). Viruses in three distinct species of the genus *Ampelovirus* (family *Closteroviridae*), *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1*, *virus-2*, and *virus-3*, have been identified in several pineapple-growing regions worldwide such as Hawaii (Hu et al. 1993), Australia (Wakman et al. 1995), Central and South America (Boroto et al. 1998), Ecuador (Alvarez et al. 2015), and recently West Africa (Nyarko and Asare-Bediako 2019). The 'Queen Victoria' cultivar is the most widely cultivated pineapple in Reunion Island and is the main fruit crop exported. From October 2016 to February 2018, leaves from four pineapples (cv. Queen Victoria) from four different plots showing symptoms of wilt disease were collected in Reunion Island. Three sets of primers were used in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the specific detection of members of each virus species: PMW1dF/R for pineapple mealybug wilt-associated virus-1 (PMWaV-1) (Gambley et al. 2009), PMWaV2-223/224 for PMWaV-2 (Sether et al. 2005), and Wilt3dF/R for PMWaV-3 (Gambley et al. 2009). Primer sets were designed from the RdRp genes for PMWaV-1 and -3, and from the HsP70 gene for PMWaV-2. Expected DNA fragments of 303, 610, and 424

nucleotides (nt) were obtained from the four samples for PMWaV-1 and -2, and from one sample for PMWaV-3, respectively. The fragments were directly sequenced in both directions, assembled, and analyzed (Geneious version R11.1.2). The four consensus sequences (accession nos. MT447832 to 835), obtained from the 303-nt DNA fragments, shared 91.6 to 95.8% nt and 95.5 to 97% amino acid (aa) identities with Hawaiian (AF414119, MH704740) and Australian (EF467924, EF467925, and EF463006) isolates of PMWaV-1. The four consensus sequences (MT469951 to 954), obtained from the 610-nt DNA fragments, shared 98.3 to 99.8% nt and 97.7 to 100% aa identities with Hawaiian isolates of PMWaV-2 (AF283103, MH704741). The single consensus sequence (MT469955), obtained from the 424-nt DNA fragments, shared 96 to 97.3% nt and 100% aa identities with Hawaiian (DQ399259, MH704742) and Australian (EF467918) isolates of PMWaV-3. To further confirm the presence of members of PMWaV-1, -2, and -3 in the four pineapple samples, three specific primer sets designed from the coat protein (CP) genes were used (FJ08-1/2 [Shen et al. 2009] CP229/CP230, and CP231/CP232 [Hernandez-Rodriguez et al. 2014], respectively, for each virus). Amplicons of the expected sizes were obtained from the four samples for PMWaV-2, and from two samples for PMWaV-1 and -3. The direct sequencing of the amplicons confirmed the previous results. The consensus sequences of the CP of PMWaV-1 (MT990947 to 948), PMWaV-2 (MT990949 to 952), and PMWaV-3 (MT990953 to 954) shared 98 to 100% nt and 99 to 100% aa identities with several isolates of the viruses from Hawaii (MH704740 to 742, MN539274), Taiwan (LC507819), and Cuba (DQ225114). To our knowledge, this is the first report of PMWaV-1, -2, and -3 on wilt diseased pineapples in Reunion Island. The spread of this ampelovirus complex in the pineapple fields of Reunion represents potentially a major threat for this agricultural export sector.

References:

- Alvarez, R. A., et al. 2015. New Dis. Rep. 31:15.
Boroto, E. G., et al. 1998. Plant Dis. 82:263.
Gambley, C. F., et al. 2009. J. Virol. Methods 155:187.
Hernandez-Rodriguez, L., et al. 2014. Crop Prot. 65:43.
Hu, J. S., et al. 1993. Acta Hort. 334:411.
Nyarko, J., and Asare-Bediako, E. 2019. New Dis. Rep. 40:18.
Sether, D. M., et al. 2005. Plant Dis. 89:450.
Shen, B. N., et al. 2009. Plant Dis. 93:196.
Wakman, W., et al. 1995. Aust. J. Agric. Res. 46:947.

The author(s) declare no conflict of interest.

Keywords: wilt disease, *Ananas comosus*, *Ampelovirus*, South West Indian Ocean Islands

[†]indicates the corresponding author.
J.-M. Lett; lett@cirad.fr

Article 2

Association entre symptômes et cortège viral de la *Mealybug wilt disease of pineapple* à La Réunion : étude de parcelles de rejets traditionnels et de vitroplants

Association entre symptômes et cortège viral de la *Mealybug wilt disease of pineapple* à La Réunion : étude de parcelles de rejets traditionnels et de vitroplants

(En préparation pour soumission dans *Crop Protection*)

Delphine Massé^{1,2*}, Nathalie Cassam¹, Bruno Hostachy¹, Pierre-Yves Teycheney³, Pierre Lefeuvre³, Jean-Michel Lett³, Frédéric Chiroleu³

¹ANSES - LSV RAPT, F-97410, Saint Pierre, La Réunion, France

²Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97410 St Pierre, La Réunion, France

³CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 St Pierre, La Réunion, France

*Auteur pour correspondance: delphine.masse@anses.fr

Résumé

La production d'ananas est contrainte par une maladie virale appelée *Mealybug wilt disease of pineapple* (MWD) présente dans le monde entier. Cette maladie a été décrite comme associée à un complexe viral, les pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaV), qui appartiennent au genre *Ampelovirus*, mais aussi potentiellement à d'autres genre viraux tels que les genres *Badnavirus*, *Secovirus*, ou *Vitivirus*. Les conclusions variables des études précédentes sur l'étiologie de la maladie incitent à mieux comprendre comment, localement, la diversité des virus trouvés impacte l'état sanitaire des cultures. Ainsi, afin de déterminer la distribution et la prévalence à La Réunion d'une partie des virus préalablement décrits comme associés à la MWD, une enquête de terrain a été menée en 2020, sur le cultivar '*Queen Victoria*' sur 15 parcelles réparties sur l'ensemble de l'île. L'indexage mené sur 450 échantillons a révélé que 93% des plants étaient infectés par au moins un des cinq virus recherchés, et que la co-infection était courante, avec un taux de 76%. Les virus les plus prévalents étaient le PMWaV1 (78%) et le PBCOV (87%), ce dernier étant décrit pour la première fois à La Réunion, alors que le PBERV n'a pas été détecté. La recherche d'une association entre la présence de virus et des symptômes foliaires relevés sur le terrain a permis de montrer que la présence des virus accentuerait le dessèchement, le flétrissement, et l'incurvation foliaire. Au contraire, nos résultats suggèrent que le rougissement ou

le jaunissement, décrits comme typique de la maladie, ne seraient pas causés par l'infection d'un ou des virus du cortège testé. S'il reste difficile d'identifier un symptôme caractéristique de la MWD, globalement, l'importance des symptômes est apparue corrélée à la présence des virus. Dans ce contexte, le faible taux d'infection virale déterminé sur les vitroplants en comparaison des parcelles plantées de rejets traditionnels, suggère que les VP pourraient être utilisés comme une alternative efficace pour limiter l'impact de la maladie sur la filière ananas de La Réunion.

1 - Introduction

L'ananas, *Ananas comosus* (L.) Merr. (*Bromeliaceae*), est une plante tropicale pérenne appartenant à la famille des Broméliacées. Originaires d'Amérique du Sud, cette espèce végétale est largement cultivée à travers le monde pour son fruit apprécié pour sa saveur sucrée. L'ananas est une plante à multiplication végétative, et sa diffusion est généralement réalisée *via* la couronne du fruit ou à partir des nouvelles pousses qui émergent à la base de la plante mère (nommés rejets traditionnels dans la suite du document) (Py *et al.*, 1984).

La production de l'ananas est mondialement affectée par une maladie virale, la *Mealybug wilt disease of pineapple* (MWD), récemment décrite au Ghana (Asare-Bediako *et al.*, 2020), à La Réunion (Massé *et al.*, 2021), en Colombie (Moreno *et al.*, 2023), au Pérou (Carrasco-Lozano *et al.*, 2023), ou encore en Indonésie (Valentino *et al.*, 2023). Cette maladie provoque une réduction de croissance et de production de fruits, les pertes de rendement pouvant atteindre jusqu'à 80% au Brésil (Santa-Cecília *et al.*, 2016). Les principaux symptômes de la maladie ont été décrits comme étant le rougissement et/ou le jaunissement des feuilles, l'enroulement vers le bas au niveau de leurs marges, le dessèchement de leurs extrémités et à la pourriture racinaire, entraînant un flétrissement progressif et la mort prématurée des plants infectés (Carter, 1933; Carter, 1945). Au-delà de la propagation par du matériel végétal contaminé, la maladie est propagée par deux espèces de cochenilles de la famille des *Pseudococcidae* (ordre des Hémiptères), *Dysmicoccus brevipes* ou 'cochenille rose de l'ananas', et *D. neobrevipes*, ou 'cochenille grise de l'ananas' (Beardsley, 1959; Carter, 1963). Alors qu'initialement

(Carter, 1933; Carter, 1935), suggérait que les symptômes de la MWD étaient associés à un relargage de phytotoxines par la plante lors des attaques de cochenilles, l'implication d'un virus a été prouvée dans les années 60 (Ito, 1962). Les travaux ont ensuite permis d'identifier des particules virales filamenteuses et flexueuses (Gunasinghe and German, 1986, 1987) par la suite assignées à la famille des *Closteroviridae* (Agranovsky, 1996; Bar-Joseph *et al.*, 1979) et au genre *Ampelovirus* (Karasev, 2000). Plus tard, les équipes Hawaïenne (Sether *et al.*, 2005) et Australienne (Gambley *et al.*, 2008b) ont associé la MWD à un complexe de trois virus appartenant au genre *Ampelovirus* (famille *Closteroviridae*), nommé pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV), avec le PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3, reconnus par l'ICTV. Depuis, le virome associé à l'ananas s'est largement étoffé avec la description d'autre virus du genre *Ampelovirus*, PMWaV5 génome partiel (Gambley *et al.*, 2008b) et génome complet (Massé *et al.*, 2023), PMWaV6 (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2021), et PMWaV7 (Massé *et al.*, 2023), de Badnavirus (pineapple bacilliform CO virus ou PBCOV et pineapple bacilliform ER virus ou PBERV ; (Gambley *et al.*, 2008a)), de *Sadwavirus* (*Secoviridae*, PSV A à D ; (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022a; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b)), et de *Vitivirus* (*Betaflexiviridae*, PinVA ; (Massé *et al.*, 2022)).

En parallèle, malgré les études menées au fil des découvertes virales sur les possibles associations entre virus et maladie, il n'existe encore à ce jour pas de consensus sur le cortège viral réellement associé à la MWD. Alors que certains travaux menés à Hawaï, Cuba et au Brésil ont montré que les symptômes de la MWD seraient dus à la présence simultanée du PMWaV2 et de cochenilles (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014; Peron *et al.*, 2019; Sether and Hu, 2002), d'autres conduit en Australie suggère que la maladie serait plutôt associée à la présence du PMWaV1 et du PMWaV3 (Gambley *et al.*, 2008b). Les auteurs de cette dernière étude suggéraient d'ailleurs que d'autres virus que ceux du genre *Ampelovirus* pourraient être impliqués dans une association synergique.

En conséquence, l'étiologie de la MWD reste encore largement non élucidée, malgré la nécessité de mieux la comprendre pour la mise en place et l'évaluation de méthode de lutte adaptées. Celles-ci restent encore aujourd'hui très limitées avec le développement de variétés résistantes (Perez *et al.*, 2005), ou la mise en place d'itinéraires techniques raisonnés (rotation des cultures, broyage des

résidus, lutte contre les cochenilles) (Nurbel *et al.*, 2021; Soler *et al.*, 2020). L'utilisation de matériel contaminé lors de la replantation des parcelles reste une limitation majeure dans la lutte contre la MWD et en conséquence l'utilisation de vitroplants (VP) garantis indemnes de virus a été mise en avant comme une stratégie prometteuse pour limiter l'impact des maladies virales (Umber *et al.*, 2020). Cette alternative de culture de tissus *in vitro* a été envisagée par Sether *et al.*, (2001), *via* la culture de méristèmes d'ananas. En 2013, Hernández-Rodríguez *et al.*, ont introduit des VP d'ananas en plein champ à Cuba. Les résultats démontrent qu'en plus d'un taux de survie élevé (95%), tous les paramètres de croissance mesurés ont été améliorés (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013). A La Réunion, le projet ANANABIO (2016-2018) a testé un dispositif de multiplication en 'pépinière' en plein champ de rejets de VP, pour les utiliser ensuite comme matériel de plantation. Cette approche permettrait de réduire les coûts d'implantation de parcelle, tout en apportant des garanties sanitaires, lorsqu'il est accompagné d'un itinéraire technique raisonné (Nurbel *et al.*, 2021).

Ainsi, afin de mieux comprendre l'étiologie de la MWD, son épidémiologie à La Réunion et d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de VP pour la culture d'ananas, une enquête de terrain accompagnée d'un indexage de la présence de cinq virus précédemment décrits comme associés à la maladie a été menée (PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PBCOV et PBERV). L'analyse conjointe de la présence de virus et de symptômes a permis d'apporter un éclairage sur les symptômes réellement associés à la présence de virus mais aussi de confirmer l'intérêt de l'utilisation de VP pour l'implantation de parcelle d'ananas. Nos résultats pointent aussi vers la nécessité de mener des tests biologiques en conditions contrôlées afin de mieux appréhender cette maladie complexe.

2 - Matériels et méthodes

Enquête de terrain

Entre septembre et octobre 2020, une enquête de terrain a été menée en collaboration avec la FDGDON (Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles), la DAAF Réunion (Direction de l'Agriculture et de la Forêt) et le Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV

Réunion, Anses). Quinze parcelles de différentes surfaces (150 à 7 760 ares), plantées en cultivar 'Queen Victoria', et représentatives des zones de production d'ananas sur l'île de La Réunion (France) ont été visitées (**Figure 1**).

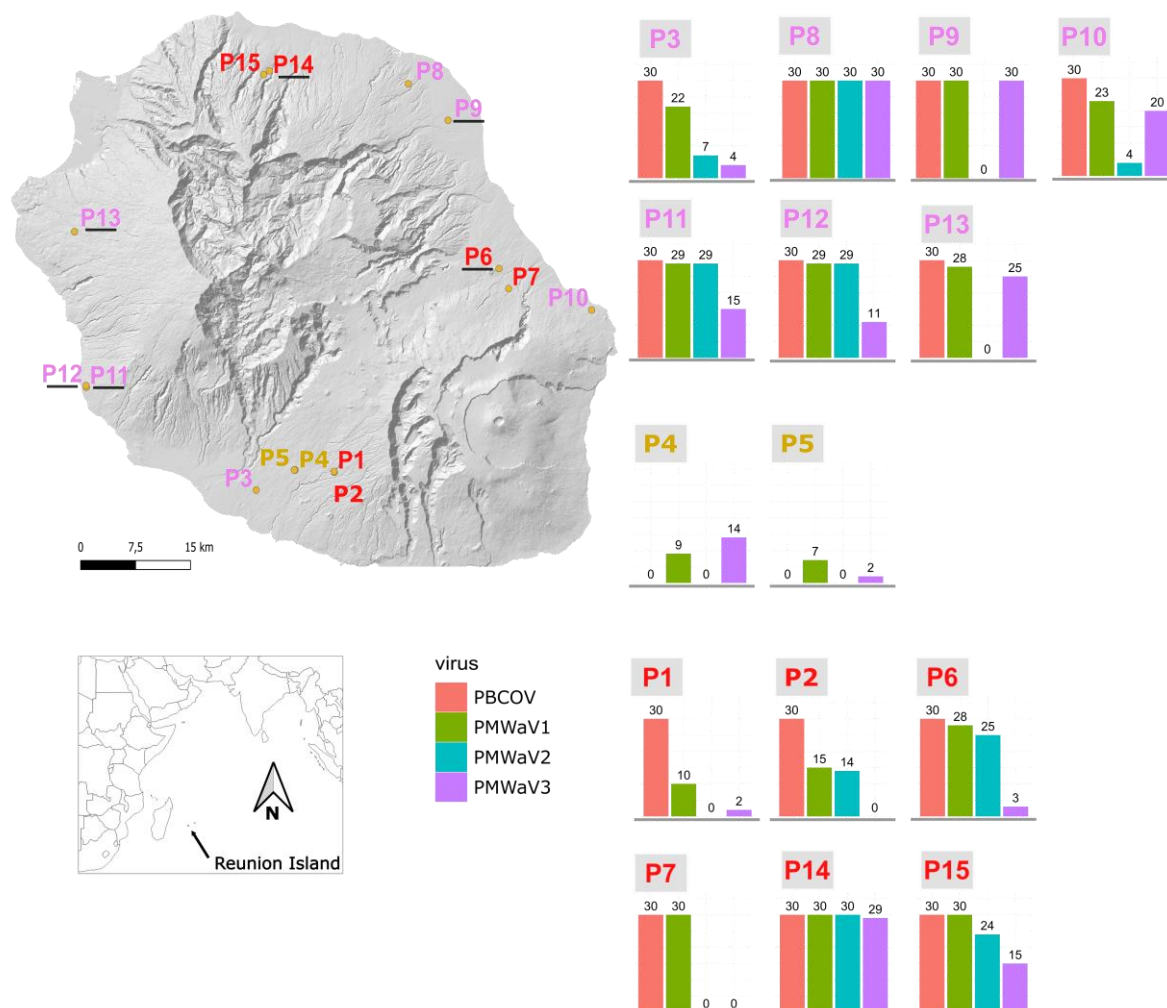


Figure 1 : Distribution géographique des 15 parcelles d'ananas visitées lors de l'enquête réalisée en 2020 sur l'île de La Réunion. Les numéros des parcelles (P) sont colorés selon la typologie de la parcelle obtenue sur les bases de leurs itinéraires techniques (ITK des parcelles en rose, jaune, rouge ; P4-P5 issues de vitroplants). Les parcelles ayant subi le TIF sont soulignées en noir. Pour chaque parcelle, un histogramme présente les effectifs de chaque virus indexé, le PBCOV (en rose), le PMWaV1 (en vert), le PMWaV2 (en bleu), et le PMWaV3 (en violet) est présenté sur la droite de la carte. Les prélèvements se sont tous avérés être négatifs pour PBERV.

Sur les quinze parcelles (**Table Supplémentaire 1**), deux étaient plantées avec des rejets issus de VP et les treize autres avec des rejets dit traditionnels, c'est-à-dire issus d'anciennes cultures. Pour chaque parcelle, 30 plants ont été collectés (soit 450 plants au total) selon un trajet en 'W', et deux feuilles entières de chaque plant ont été prélevées. La partie basale blanche des feuilles a été coupée en petits morceaux de ~0,5 cm² et stockée à -80°C jusqu'à utilisation. Les prélèvements

étaient accompagnés d'un questionnaire portant à la fois sur l'itinéraire technique de la parcelle (Altitude, Age, Stade de développement 'végétatif – fructification – multiplication', réalisation du traitement d'induction floral ou TIF (servant à synchroniser la fructification), Rotation des cultures, Broyage des résidus, Culture mitoyenne et Historique de la parcelle), ainsi que sur l'état sanitaire vis-à-vis de la MWD. La présence de cochenilles (*mealybug*) ainsi que les symptômes (rougissement (*reddening*), jaunissement (*yellowing*), flétrissement (*wilting*), dessèchement (*dieback*) et incurvation (*curveling*) des feuilles ont été annotés pour chaque plant collecté (**Figure 2**). Pour chaque type de symptôme était précisé la sévérité notée nulle (0), faible (fa), moyenne (mo) ou forte (tfo). Le nombre de cochenilles observé sur chaque plant était noté (0) en l'absence de cochenille, et (moyen) ou (fort) lors de l'observation de 1 à 10 cochenilles et de plus de 10 cochenilles respectivement.

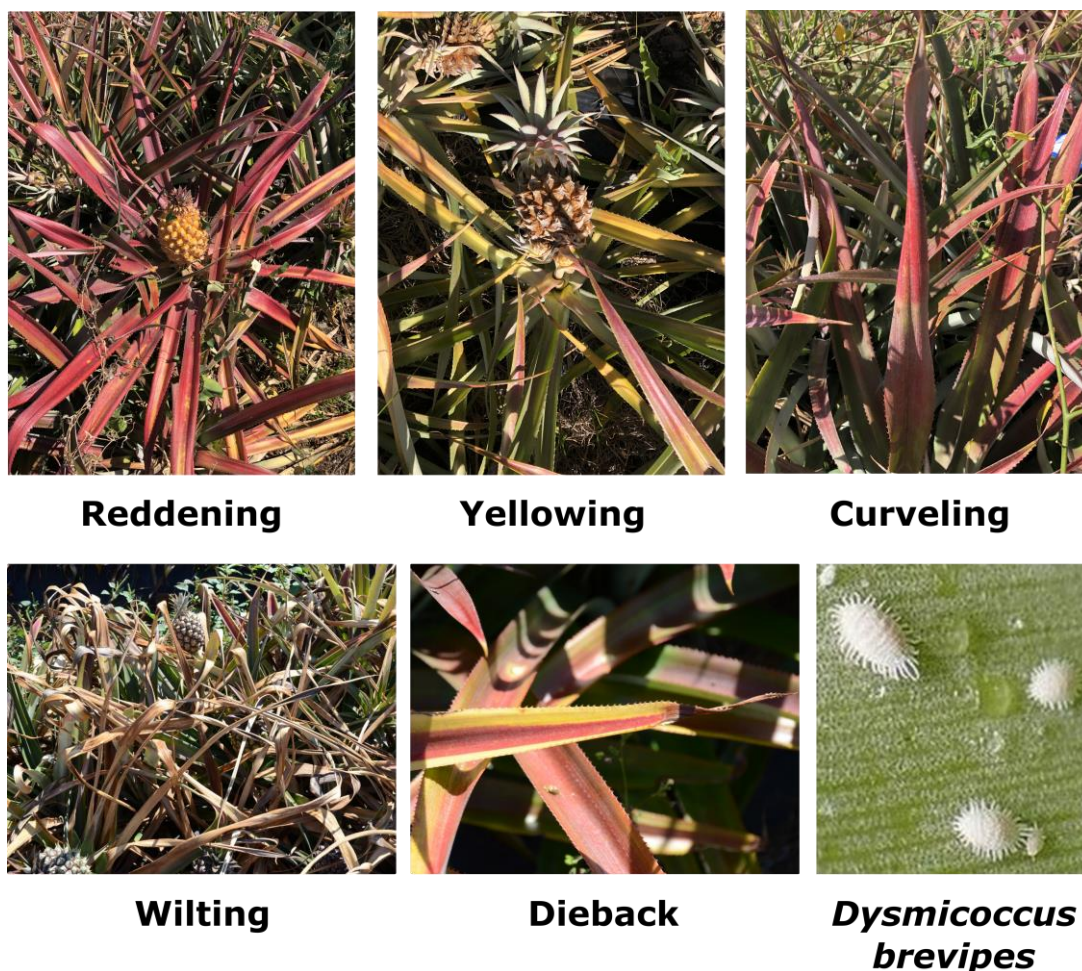


Figure 2 : Photographies des principaux symptômes décrits sur les feuilles d'ananas infectés par la MWD (rougissement (*reddening*), jaunissement (*yellowing*), flétrissement (*wilting*), dessèchement (*dieback*) et incurvation (*curveling*)) et de la cochenille *Dysmicoccus brevipes*, le principal insecte vecteur.

Suivi de parcelles de Vitroplants

Cinq lignées de rejets issus de VP ont été suivies chaque année, sur une période variant de trois à cinq ans suivant la parcelle. Un maximum de trois générations (une génération étant la succession des trois phases suivant la plantation, soit les phases de croissance, fructification et production de rejet servant à initier la génération suivante) a pu être suivi pour ces parcelles (**Table 1**), la nouvelle génération pouvant être plantée sur le même site ou sur une autre parcelle. Selon l'année, entre deux et 60 plants ont été collectés et notés selon les modalités décrites plus haut, et indexés sur les cinq principaux virus de l'ananas.

Table 1 : Suivi de la contamination des rejets d'ananas issus de VP entre 2016 et 2021 sur l'île de La Réunion, avec le numéro de lignée (*Lignee*), la date de prélèvement (*Sample collection date*), l'année de plantation (*Planting date*), le nombre de génération (*Generation*), le lieu de prélèvement (*Localisation*), l'historique de la parcelle l'année précédant la plantation (*Pineapple history n-1*), les cultures mitoyennes (*Adjoining crop*), la description des symptômes (*Symptoms*), le nombre de plants virosés par rapport au nombre total de plants collectés (*Number virus-infected plants/Total number plants collected*), le nombre de plants positifs au virus (PMWaV1) et (PMWaV3), le nombre de plants co-infectés (*Co-infection*), le nombre de plants avec présence de cochenilles (*Number plants with mealybug*).

Lignee	Sample collection date	Planting date	Generation	Localisation	Pineapple history n-1	Adjoining crop	Symptoms	Number virus-infected plants / Total number plants collected ²	PMWaV1	PMWaV3	Co-infection	Number plants with mealybug
L1	december 2021	2020	G3	Sud (St Pierre)	No	pineapple	No	1/60	1	0	0	0
	march 2016	2016	G1	Ouest (Boucan)	No	other	reddening	0/24	0	0	0	NA
	february 2017	2016	G1	Ouest (Boucan)	No	other	yellowing, reddening	0/26	0	0	0	NA
L2	march 2018	2016	G1	Ouest (Boucan)	No	other	NA	0/10	0	0	0	NA
	may 2019	2018	G2	Sud (Le Tampon)	No	pineapple	No	0/51	0	0	0	NA
	june 2020	2020	G3	Sud (St Pierre)	Yes	pineapple	reddening	0/45	0	0	0	1
	december 2021	2020	G3	Sud (St Pierre)	Yes	pineapple	yellowing, reddening, wilting, curveling	14/31	6	9	1	14
L3	february 2019	2019	G1	Sud (St Pierre)	Yes	pineapple	No	0/37	0	0	0	NA
	june 2020	2019	G1	Sud (St Pierre)	No	pineapple	No	0/2	0	0	0	NA
	december 2021	2019	G1	Sud (St Pierre)	No	pineapple	reddening, wilting	9/9	4	9	4	5
L4	september 2020 (P4)	2019	G1	Sud (Le Tampon)	No	other	reddening, yellowing, wilting, curveling	21/30	9	14	2	0
	december 2021	2019	G1	Sud (Le Tampon)	No	other	dieback, wilting	15/18	8	13	6	1
L5	september 2020 (P5)	2019	G1	Sud (Le Tampon)	No	other	reddening, yellowing, wilting	8/30	7	2	1	9
	december 2021	2019	G1	Sud (Le Tampon)	No	other	No ¹	17/20	16	8	7	0

¹: grass-covered plot

²: The number of virus-infected plants corresponds to the sum of plants infected by PMWaV1 and PMWaV3, minus the number of co-infected plants.

Extraction des acides nucléiques

Pour chaque plant d'ananas analysé dans le cadre de l'enquête et du suivi des vitroplants, 100 mg de feuilles congelées et placées dans un sachet en polyéthylène grillagé de type ELISA, ont été broyées en utilisant un broyeur à billes Homex (Bioreba) contenant un tampon PBST-PVP 10%, selon le ratio masse/volume de 1/10. Après centrifugation de 900 µL de broyat à 20 000 g pendant 15 minutes en conditions réfrigérées, et re-suspension du culot avec 350 µL de tampon PBS, les acides nucléiques totaux (ADN et ARN) ont été extraits en utilisant le kit InnuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena), selon les recommandations du fournisseur de manière automatisée avec le robot extracteur

KingFisher (ThermoFisher Scientific). L'extraction simultanée de l'ADN et de l'ARN a permis de travailler sur un seul extrait d'acide nucléique total, conservé à -80°C avant utilisation.

Indexation moléculaire des principaux virus de l'ananas

Après extraction des acides nucléiques, les trois principaux *Ampelovirus* décrits sur ananas, PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 ont été indexés sur tous les plants d'ananas, par RT-PCR multiplexe (Massé *et al.*, 2023).

L'indexation des deux *Badnavirus* connus sur ananas a été réalisée par PCR en utilisant les amorces sens et anti-sens spécifiques décrites par (Gambley *et al.*, 2008a) pour la détection du PBCOV (PBV2dF [GAGGCACAGAAGACTTTATTGCTG] et PBV2dR [TGCAAATTCCTCCCCATCCTTCCAT]), et du PBERV (PBVd4F [GGTACGATGGCTCACGTTTT] et PBV4dR [GCTTGTTACAGCCGCACATA]), et en développant leur multiplexage. Le mélange réactionnel était composé de 5 µL de tampon PCR 5X, 3 µL de MgCl₂ 25mM, 0,5 µL de dNTPs à 10 mM, 2 µL d'amorces à 10 mM pour les amorces spécifiques du PBCOV, et 1 µL d'amorces à 10 mM pour les amorces spécifiques du PBERV, 0.4 µL de Taq ADN polymérase, et de l'eau exempte de nucléase, pour un volume total de réaction de 25 µL. Les réactions ont été effectuées à partir de 2 µL d'extraits d'acides nucléiques totaux de plante à l'aide du kit One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) pour les *Ampelovirus*, et du kit GoTaq G2 Hot Start Polymerase (PROMEGA, US) pour les *Badnavirus*, dans un thermocycleur Veriti 96-Well Fast (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, US). Les conditions du cycle d'amplification étaient les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 60°C pendant 30 secondes, extension à 72°C pendant 1 minute, puis extension finale à 72°C pendant 10 minutes. La présence d'amplicons de la taille attendue (281, 610 et 402 nucléotides, respectivement pour le PMWaV1, le PMWaV2 et le PMWaV3 et 513 et 236 nucléotides, respectivement pour le PBCOV et le PBERV) a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5% avec un tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) suivi d'une incubation dans un bain de bromure d'éthidium et d'une visualisation sous lumière UV.

Séquençage haut débit

Préparation des échantillons

Afin de déterminer la présence d'espèces virales autres que celles indexées par multiplexe PCR, dix échantillons provenant de la troisième génération de la lignée d'ananas issue de vitroplants notée L2 (VP après cinq années en plein champ), collectés en 2021 et conservés à -80°C, ont été choisis d'après leur statut négatif sur les cinq virus indexés (PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3, PBCOV, PBERV) malgré la présence de symptômes marqués (fort et moyen) (**Table 2**). Les symptômes répertoriés pour ces dix plants étaient le flétrissement (N = 2), l'incurvation (N = 1), le jaunissement (N = 2) et le rougissement (N = 8), avec deux échantillons cumulant plusieurs de ces symptômes (flétrissement et rougissement pour le E24 ; flétrissement, rougissement et incurvation pour le E25). Il faut noter que du fait du faible nombre de plants négatifs à la présence des cinq virus testés, il n'a pas été possible de tester des échantillons présentant ces symptômes de manière isolée. Pour cette même raison, aucun plant présentant du dessèchement n'a pu être testé (**Table 2**).

Pour rappel, un TIF avait été pratiqué sur cette parcelle environ 6 mois avant la récolte des plants. Celle-ci se trouvait à proximité de culture d'ananas plantée en rejets traditionnels virosés, et également plantée sur une ancienne culture d'ananas. Enfin, pour cinq de ces échantillons, des cochenilles avait été observées.

Table 2 : Description des symptômes présents sur les VP séquencés en HTS, et résultats des analyses de l'assemblage *de novo* et du BLASTn, avec le nom de l'échantillon (*sample*), les différents symptômes : rougissement (*reddening*), jaunissement (*yellowing*), flétrissement (*wilting*), dessèchement (*dieback*) et incurvation (*curveling*), le nombre total de *reads* obtenus (*Total reads number*), le nombre de Mega bases séquencées (*Mbases*), le résultat du BLASTn avec au moins trois *reads* (BLASTn >3), et le nombre de *reads* assignés à cette accession le cas échéant (*Nb reads assigned*).

Sample	Dieback	Wilting	Yellowing	Curveling	Reddening	Mealybug	Total reads number	Mbases	BLASTn > 3 viral database (Id)	Nb reads assigned
E10	0	0	0	0	tfo	1	10 071 116	3 021	0	0
E11	0	0	mo	0	0	2	10 512 677	3 154	0	0
E13	0	0	0	0	tfo	1	10 287 507	3 086	0	0
E18	0	0	0	0	mo	0	9 812 127	2 944	0	0
E2	0	0	0	0	mo	0	8 537 418	2 561	0	0
E22	0	fa	mo	0	fa	0	11 529 605	3 459	0	0
E24	0	mo	0	0	mo	0	10 928 612	3 279	0	0
E25	0	tfo	0	mo	tfo	1	21 323 665	6 397	0	0
E29	0	fa	0	0	mo	0	9 950 184	2 985	NC_043406 (PMWaV3)	13
E9	0	0	0	0	mo	2	8 994 782	2 698	0	0

Pour tous les processus, depuis l'extraction jusqu'à l'analyse des données, deux échantillons dit 'alien' (Massart *et al.*, 2022; Rong *et al.*, 2023) ont été rajoutés afin d'évaluer de potentielles contaminations ou biais d'analyses : i) un échantillon de bananier co-infecté par deux virus du genre *Badnavirus*, le banana streak OL virus (BSOLV) et le banana streak GF virus (BSGFV), virus à ADN circulaire, et un virus de la famille des *Betaflexiviridae*, le banana mild mosaic virus (BanMMV), virus à ARN, (cultivar FHIA21, Cameroun) ; et ii) un échantillon de patate douce infecté par un virus du genre *Potyvirus*, le sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), virus à ARN (cultivar patate douce violette, La Réunion).

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant, y compris le traitement optionnel à la DNase (DNase I, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US). La concentration d'ARN a été déterminée à l'aide d'un fluorimètre Qubit 4 et du Qubit RNA BR assay kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US). La qualité des extraits d'ARN a été évaluée grâce à la valeur du *RNA Integrity Number* (RIN) obtenue à l'aide du kit Agilent RNA 6000 Pico chip pour TapeStation (Agilent Technologies, California, US). Par échantillon, un total de 2 µg d'extraits d'ARN total a été précipité avec 2,5 volumes d'éthanol 99% et 0,1 volume d'acétate de sodium, avant d'être expédié au prestataire de service pour le séquençage. La préparation des librairies et le séquençage ont été effectués chez Azenta (USA) à l'aide des kits Ribozero plant rRNA depletion et TruSeq stranded total RNA library Prep (Illumina, San Diego, CA, US), suivis d'un séquençage *paired-end* (2x150pb), sur un appareil Illumina NovaSeq.

Analyses bio-informatiques des données HTS

L'assemblage *de novo* des reads Illumina a été réalisé à l'aide de SPAdes v3.13 (Bankevich *et al.*, 2012) avec le support de la Plateforme MESO@LR. La recherche de contigs viraux a été réalisée à l'aide de recherches BLASTn et BLASTx à partir de la base de données de séquences virales de référence obtenue à partir de GenBank en avril 2023. Les statistiques de couverture des contigs viraux identifiées ont été obtenues après alignement des *reads* Illumina à l'aide de BWA-MEM (BWA v0.7017.1 ; (Li and Durbin, 2009)) et après analyse des alignements à l'aide de Samtools v1.9 (Li *et al.*, 2009) *via* la plateforme Galaxy Migale bioinformatics Facility (<https://migale.inrae.fr>).

Analyses statistiques

Afin d'analyser la répartition des virus, les caractéristiques des parcelles, ainsi que d'étudier l'éventuelle association entre virus et symptômes, les données issues de l'enquête ont été traitées à l'aide du logiciel R V4.2.0 (April, 2022) (R Development Core Team, 2022).

Tout d'abord, afin de comparer les prévalences virales, une comparaison des effectifs observés et théoriques des populations virales a été réalisée selon un test exact de Fisher. L'obtention d'un Odds-Ratio (OR) supérieur à 1 suggère une sur-représentation des effectifs observés par rapport à l'attendu. Plus l'OR est éloigné de 1, plus la sur-représentation ($OR > 1$) ou la sous-représentation ($OR < 1$) est importante. Afin d'observer si la fréquence de co-infection de certaines combinaisons virales était supérieure à ce qui peut être attendu par chance (selon l'ordre d'entrée des virus), des tests exacts de Fisher ont été réalisés entre les effectifs théoriques et observés des différentes paires de virus.

Pour caractériser la typologie des parcelles, six variables qualitatives : origine des plantations (VP ou rejet traditionnel), rotation des cultures (oui/non), broyage des résidus (oui/non), parcelle d'ananas mitoyenne (oui/non), TIF déjà effectué au moment du prélèvement (oui/non), ont été sélectionnées dans le groupe appelé 'ITK qualitative' (ITK pour 'itinéraire technique') ; et deux variables quantitatives : altitude et âge de la parcelle ont été sélectionnées dans le groupe 'ITK quantitative'. Une analyse factorielle multiple (AFM) sur ces deux groupes a été réalisée en utilisant la fonction MFA du *package* FactoMineR (Husson *et al.*, 2008). A partir des coordonnées obtenues, les distances euclidiennes entre parcelles ont été calculées. Puis une classification hiérarchique ascendante a été réalisée sur laquelle le nombre optimal de groupes de parcelles a été calculé en utilisant la fonction NbClust du *package* NbClust, qui fournit 30 indices pour proposer le meilleur schéma de partitionnement avec la méthode kmeans (Charrad *et al.*, 2014). Cette analyse a été mise visuellement en lien avec deux autres groupes de variables quantitatives, l'un nommé 'virus' (indiquant le taux de présence par parcelle de chacun des quatre virus PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PBCOV), et l'autre 'symptômes' (indiquant le taux de présence par parcelle des cinq symptômes et des cochenilles). Pour cette analyse, les annotations de symptômes notées faible (fa) ont été considérées comme absence de symptômes (0).

Les parcelles ont ensuite été classées selon la présence de virus et les scores de symptômes. Pour la présence de virus, une analyse en composantes principales (ACP) normée a été réalisée à l'aide de la fonction PCA (FactoMineR) (Husson *et al.*, 2008) sur les effectifs de chacun des virus par parcelle. Pour la présence de symptômes, une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée à l'aide de la fonction CA (FactoMineR) sur l'ensemble des scores de symptômes (chaque variable représentant le nombre de plants par parcelle ayant le même score pour un symptôme donné). A partir des coordonnées des deux analyses, deux arbres de classification hiérarchique ascendante ont été construits. Ces arbres ont alors été visuellement comparés avec celui issu des données ITK afin de déterminer s'il existait des relations entre ITK, présence des virus et scores des symptômes.

Afin d'avoir un premier aperçu des corrélations pouvant exister entre présence de virus et présence de symptômes au niveau du plant, une ACP normée a été réalisée sur la base de l'ensemble des variables de présence/absence des virus et des symptômes. La sévérité des symptômes a été transformée en donnée binaire (présence/absence) en considérant les annotations 'faible' (fa) comme données manquantes (NA) du fait de l'incertitude de l'annotation, et les annotations 'moyen' (mo) et 'fort' (tfo) rassemblés dans la catégorie présence. Pour tester de manière complémentaire les relations individuelles entre présence/absence de virus et de symptômes, une comparaison des effectifs de plants d'ananas symptomatiques (toujours avec l'hypothèse $fa = NA$), en fonction de la détection de chaque virus, a été réalisée selon un test exact de Fisher, en considérant les données comme indépendantes. Un calcul de puissance a été réalisé afin de déterminer si nos effectifs étaient suffisants pour valider le résultat des tests. Ce calcul permet d'estimer le risque d'erreur de seconde espèce, c'est à dire le risque de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est fausse.

3 - Résultats

3.1 – Enquête : état sanitaire des parcelles d’ananas à La Réunion

Présence des symptômes de la MWD et des cochenilles

Lors de l’enquête, les symptômes généralement associés à la MWD (**Figure 2**), ont été relevés et catégorisés pour chaque plant collecté (**Table Supplémentaire 2**). La représentation de la proportion des classes de sévérité de chacun des symptômes suivant la parcelle (**Figure 3 A à E**) permet de constater l’importante variabilité de la présence de ces symptômes à l’échelle de l’île.



Figure 3 : Histogrammes des pourcentages (échelle en probabilité avec 1,0 = 100%) des effectifs cumulés de présence de chaque symptôme (dessèchement (A), flétrissement (B), jaunissement (C), incurvation (D), rougissement (E), et présence de cochenilles (F), pour chaque parcelle, en fonction de l’échelle de sévérité des symptômes : absence (noté 0), faible (noté fa), moyen (noté mo) ou fort (noté tfo), et la présence des cochenilles absence (noté 0), moyen (noté 1 à 10), fort (noté supérieur à 10), avec un gradient de marron croissant allant d’absence (clair), au fort (foncé). Les trois groupes de parcelles sont représentés par trois couleurs (rose, jaune, rouge).

Le symptôme le plus fréquemment rencontré est le rougissement (**Figure 3 E**), présent sur chacune des 15 parcelles et sur la majorité des plants (N = 310 soit 69% des plants). On retrouve ensuite le jaunissement (N = 178 ; 40%) (**Figure 3 C**) et le flétrissement (N = 173 ; 38%) (**Figure 3 B**), tous deux aussi retrouvés sur l'ensemble des parcelles. Le dessèchement se retrouve moins souvent (N = 60 ; 13%) (**Figure 3 A**) dans 10 parcelles, de même que l'incurvation des feuilles (N = 32 ; 7%) (**Figure 3 D**) dans 11 parcelles. Quant aux cochenilles (**Figure 3 F**), elles ont été observées uniquement dans quatre parcelles et sur peu de plants d'ananas (N = 20 ; 4%).

Prévalence des virus

L'indexation virale de chacun des 450 plants d'ananas collecté a permis d'établir les prévalences globales et par parcelle, des PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 et PBCOV (**Table supplémentaire 3**). Le PMWaV1 a été détecté dans 78% (N = 350) des plants, le PMWaV2 dans 43% (N = 192) et le PMWaV3 dans 44% (N = 200). Le PBCOV a été détecté dans 87% (N = 390) des plants (**Figure 4**). Aucun échantillon n'a été détecté positif au PBERV. Au total, 93% des échantillons (N = 419) se sont montrés positifs à au moins un des cinq virus testés. Les 7% de plants négatifs (N = 31) se sont révélés être tous issus des parcelles de VP.

Pour ces parcelles issues de VP, 48% des plants se sont montrés positifs à au moins un des virus contre 100% pour les rejets traditionnels. Alors que le PBCOV était détecté pour l'ensemble des plants issues des rejets traditionnels, il était absent pour toutes les plants issus de VP. Pour ces derniers, seuls le PMWaV1 (N = 16 ; 26%) et le PMWaV3 (N = 16 ; 26%) ont été détectés.

Co-occurrence

Au total, 343 cas de co-infection (représentant 76,2% des plants) ont été trouvés (**Figure 4**).

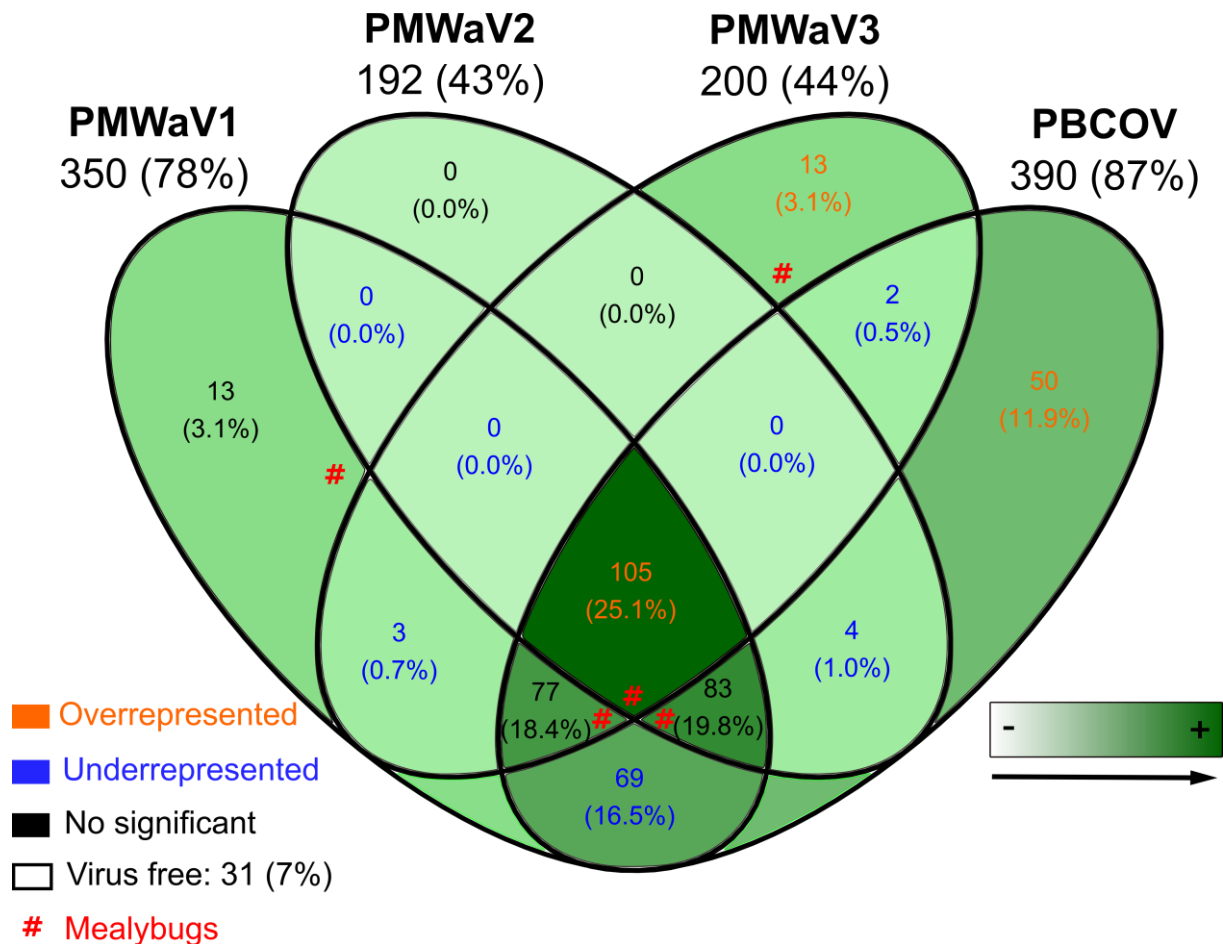


Figure 4 : Diagramme de Venn représentant la fréquence de chaque infection et combinaison d'infection mixte de virus dans les plants d'ananas indexés. Le calcul des pourcentages est réalisé sans compter les 31 plants indemnes de virus (N = 419), et est notifié par un gradient de couleur verte. La présence de cochenilles dans les combinaisons est signalée par un dièse rouge. Le résultat du test exact de Fisher à 5% sur la comparaison des effectifs observés et théoriques des différentes combinaisons est présenté en orange lorsque la combinaison testée est significativement sur-représentée, en bleu si sous-représentée, et en noir lorsque c'est non significatif.

Les infections multiples les plus courantes étaient les infections quadruples (PMWaV1/PMWaV2/PMWaV2/PBCOV) trouvées dans 105 plants (25,1%), suivies par PMWaV1/PMWaV2/PBCOV dans 83 plants (19,8%), PMWaV1/PMWaV3/PBCOV dans 77 plants (18,4%) puis PMWaV1/PBCOV dans 69 plants (16,5%). Des infections simples par PMWaV1 ou PMWaV3 ont été enregistrées chacune dans 13 plants (3,1%), toutes provenant de parcelles issues de VP. PBCOV a été détecté seul dans 50 plants (11,9%). Les deux virus les plus prévalents, PMWaV1 et

PBCOV, sont présents en grande majorité en co-infection. Il est à noter que certaines combinaisons virales n'ont pas été retrouvées, notamment quatre des sept combinaisons possibles impliquant le PMWaV2. Ce virus n'a d'ailleurs jamais été détecté en infection simple. Les résultats du test exact de Fisher suggèrent que certaines combinaisons sont significativement sur-représentées (**Figure 4**, en orange) comme la quadruple infection (25%, avec OR = 2,06 ; $p < 0,001$), la simple infection par le PBCOV (11,9% avec OR = 1,89 ; $p < 0,001$) et celle par le PMWaV3 (3,1% avec OR = 4,44 ; $p = 0,03$). D'autre part, certaines combinaisons sont significativement sous-représentées (**Figure 4**, en bleu), comme PMWaV1/PBCOV (16,5%, avec OR = 0,66 ; $p = 0,02$), et trois combinaisons incluant le PMWaV2 (0%).

3.2 – Enquête : analyses préliminaires d'association symptômes/virus en fonction de l'itinéraire technique

Sur la base des coordonnées de l'AFM réalisée sur les variables liées à l'itinéraire technique ITK (variables qualitatives et quantitatives), trois typologies de parcelles ont pu être déterminées (**Figure 5**). Un premier groupe (*cluster*), (**Figure 5 A et D**, groupe 1 en jaune) contient uniquement les deux parcelles issues de VP. Celles-ci sont caractérisées par l'absence de TIF, la rotation des cultures, le non broyage des résidus et la non mitoyenneté avec d'autres parcelles plantées en ananas. Ces parcelles se situent à une altitude de 400 m et sont âgées de 18 mois. Un deuxième groupe (**Figure 5 A et D**, groupe 2 en rose) contient sept parcelles issues de rejets traditionnels de 12 à 14 mois. Globalement, elles n'ont pas de cultures d'ananas mitoyennes (6/7) ni subi de broyage des résidus (4/7). Elles sont implantées à des altitudes basses (100 à 529 m) et ont subi en majorité des traitements TIF (4/7). Le troisième groupe (**Figure 5 A et D**, groupe 3 en rouge) contient six parcelles plus âgées (20 mois) et implantées à une altitude plus importante (700 m). Pour celles-ci, un TIF n'a généralement pas encore été effectué (4/6), elles sont mitoyennes avec des parcelles d'ananas (6/6), les résidus sont broyés (5/6) et les cultures sont menées sans rotation (6/6).

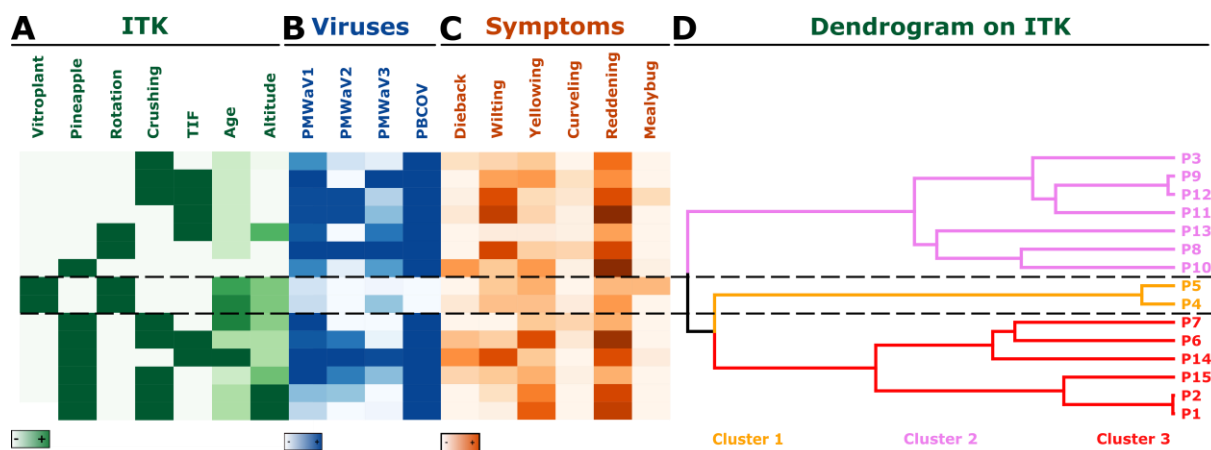


Figure 5 : Description des quinze parcelles prospectées à La Réunion en fonction de différents groupes de variables : (A) ITK, en vert ; (B) fréquence d’infection par chacun des virus, en bleu; et (C) fréquence d’observation des différents symptômes, en marron. Les variables qualitatives sont représentées en foncé lorsque la variable est présente, et en blanc quand elle est absente. Les variables quantitatives suivent un dégradé de couleur, une couleur foncée représentant un effectif élevé. (D) Arbre de classification hiérarchique ascendante des parcelles en trois groupes représentés par un dendrogramme, à partir des coordonnées de l’AFM réalisée avec les groupes de variables ITK.

Afin de déterminer si l’itinéraire technique avait un lien global important avec la structuration de la distribution des virus ou des symptômes, les classifications des parcelles, sur la base des coordonnées obtenues après une ACP sur les données d’infection virale et une AFC sur les données de notation des symptômes, ont été réalisées. Respectivement cinq et quatre groupes ont été obtenus pour les variables ‘virus’ et ‘symptômes’ (résultats non présentés). La comparaison des classifications des parcelles à partir de chacun des trois groupes de variables (‘ITK’ regroupant ITK qualitative et quantitative, ‘virus’ et ‘symptômes’) ne montre pas de congruence, hormis pour les deux parcelles issues de VP qui présentent un regroupement similaire dans chacune des classifications (**Figure 5 B et C**).

L’absence de congruence entre groupes pour les autres parcelles montre qu’il n’existe pas de relation majeure clairement interprétable associant pratiques agricoles et présence de virus ou symptomatologie.

3.3 - Enquête : étude de la relation présence de symptômes/présence de virus dans la MWD

Relation globale entre symptômes et virus au niveau de la parcelle

Afin de déterminer s'il existe des relations simples entre la présence, des symptômes de la MWD et des virus indexés dans notre étude, une ACP normée a été réalisée. La **Figure 6** représente la projection des individus et des variables sur les trois premiers axes de l'ACP (axes 1 et 2 ; 38,2% d'inertie, sur la **Figure 6 A** et axes 1 et 3 ; 36%, sur la **Figure 6 B**).

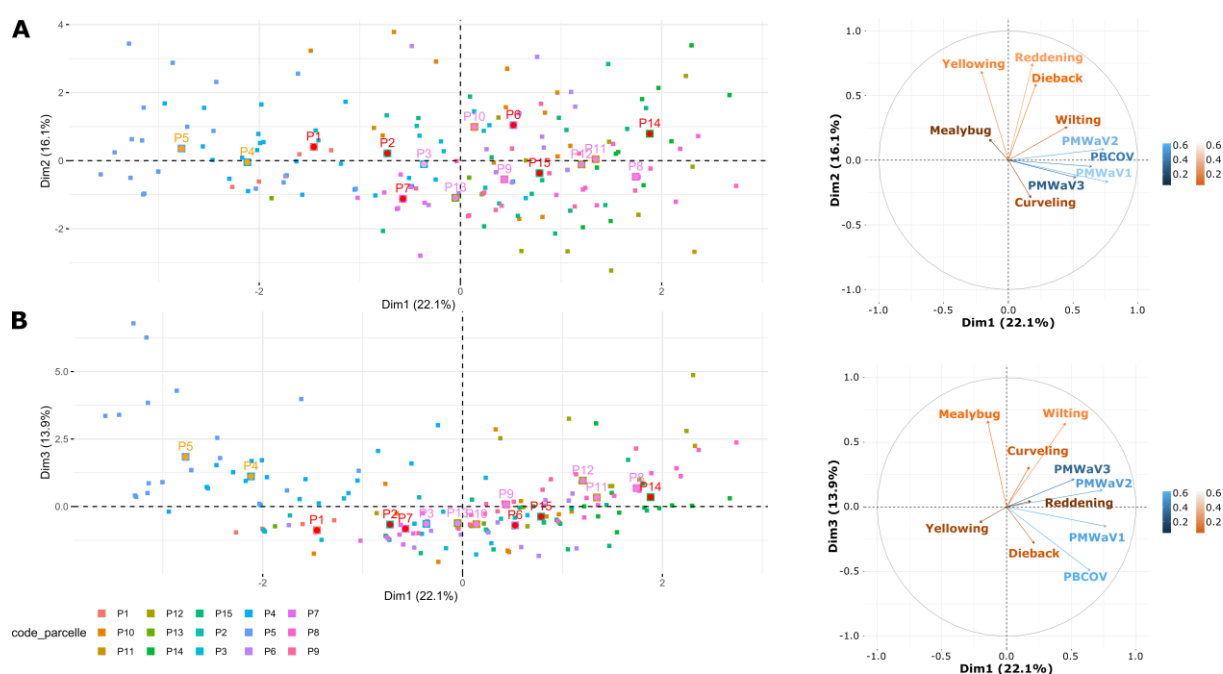


Figure 6 : Analyse en composante principale (ACP) normée sur la présence des symptômes et des virus sur les plants d’ananas : (A) et (B) représentent la projection des individus (à gauche) et des variables sur le cercle des corrélations (à droite), sur le plan factoriel 1 (A, axes 1 et 2), et 2 (B, axes 1 et 3). Le gradient de bleu représente la qualité de la projection des variables de présence de virus sur le plan (plus le bleu est clair, mieux la variable est projetée sur le plan), et le gradient de marron celui des variables de présence des symptômes. Sur les projections des individus, les barycentres de la projection des plants pour chaque parcelle sont représentés par des carrés, colorés selon la typologie de la parcelle. Les plants sont colorés en fonction de la parcelle et selon le code couleur indiqué en-dessous des figures.

La contribution apportée par les individus à l'axe 1 est de 22,1%, à l'axe 2 de 16,1%, à l'axe 3 de 13,9%, soit au total 51,9% de l'inertie totale du nuage de points. Alors que les variables 'virus' sont très bien projetées sur l'axe 1, notamment le PMWaV1 et 2, les variables de symptomatologie comme le dessèchement (*dieback*), le rougissement (*reddening*) et le jaunissement (*yellowing*) présentent plutôt des projections orthogonales sur l'axe 2. Le flétrissement (*wilting*) est mieux projeté sur l'axe 3, mais il reste la variable 'symptômes' contribuant le plus à l'axe 1 et donc la mieux associée à la présence de virus. Enfin, la projection de l'incurvation (*curveling*) se fait principalement selon l'axe 4 (résultats non présentés). La présence de cochenilles (*mealybug*) est mieux projetée sur l'axe 3 et donc de manière orthogonale aux variables de présence de virus. La position orthogonale des projections de la présence des virus et des symptômes semble suggérer qu'il n'existe pas d'association simple, claire et forte entre ces variables, en particulier pour les symptômes rougissement et jaunissement. Conformément aux observations de prévalence et à la projection des virus principalement selon l'axe 1, un gradient des parcelles les moins infectées (les parcelles issues des VP (P4 et P5), à gauche de l'axe 1) vers les plus infectées (P8 et P14, à droite de l'axe 1) est observé. L'observation de plants symptomatiques et sans virus (P4 et P5, N = 5), et également de plants asymptomatiques virosés (répartie dans toutes les parcelles, N = 69) suggère l'absence de lien clair et fort avec l'ITK.

Influence des virus sur la symptomatologie

Dans le but d'établir plus finement si des associations entre présence des virus et symptomatologie existent, telles que révélées par l'ACP précédente, ces variables ont été testées seules en faisant abstraction des variables associées aux caractéristiques de parcelles et à la conduite des cultures (**Table 3**).

Table 3 : Effectifs (*Effectif*) et pourcentages (*Percentage*) de plants d’ananas sur lesquels ont été observés les symptômes en fonction de la détection de chaque virus (*negative* ou *positive*). La sévérité des symptômes annotés en ‘faible’ sont considérés comme données manquantes. Le nombre de plants total pour chaque symptôme est indiqué en noir en haut à droite de chaque colonne. Un test exact de Fisher a permis de tester l’association symptômes/virus. Les corrélations significatives et positives sont indiquées en bleu et les négatives en orange (*) : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * $p < 0,05$). La valeur de la puissance du test (risque de rejeter l’hypothèse nulle alors qu’elle est fausse) est indiquée par un gradient de couleur verte croissant allant de 0 à 100%, le vert pale indiquant l’incapacité du test à observer une association au vu du jeu de données, notamment lorsque l’effectif est trop faible.**

Virus	Effectif Statut	Dieback 60		Wilting 173		Yellowing 178		Curveling 32		Reddening 310	
		Percentage	Effectif	Percentage	Effectif	Percentage	Effectif	Percentage	Effectif	Percentage	Effectif
PMWaV1	100 negative	9.00	9/100	29.49	23/78	65.33	49/75	0.00	0/97	94.44	68/72
	350 positive	14.74	51/346	49.34**	50/304	42.16***	29/306	9.28***	32/345	83.74*	42/289
PMWaV2	298 negative	9.38	24/256	25.84	54/209	53.96	09/202	6.72	17/253	87.43	60/183
	192 positive	18.95**	36/190	68.79***	19/173	38.55**	69/179	7.94	15/189	84.27	50/178
PMWaV3	250 negative	10.53	26/247	32.70	69/211	54.33	13/208	5.67	14/247	87.88	74/198
	200 positive	17.09	34/199	60.82***	04/171	37.57**	65/173	9.23	18/195	83.44	36/163
PBCOV	60 negative	5.00	3/60	54.29	19/35	70.97	22/31	3.57	2/56	86.67	26/30
	390 positive	14.77*	57/386	44.38	54/347	44.57**	56/350	7.77	30/386	85.80	84/331
Absence	31 negative	3.23	1/31	55.56	10/18	75.00	12/16	0.00	0/31	86.67	13/15
At least one virus	419 positive	14.2*	59/415	44.80	63/364	45.5*	66/365	0.08*	32/411	85.80	97/346

* : Fisher test significant

Rougisement (*Reddening*), Jaunissement (*Yellowing*), Flétrissement (*Wilting*), Dessèchement (*Dieback*) et Incurvation (*Curveling*)

Des résultats contrastés ont été obtenus en fonction des virus et des symptômes. Pour le **dessèchement** (*dieback*), des corrélations significatives et positives, avec la présence du PMWaV2 ($p = 0,004$), et marginalement significative avec le PMWaV3 ($p = 0,051$), ainsi qu’avec le PBCOV ($p = 0,041$) ont été trouvées. Pour le PMWaV1, aucune association n’est trouvée ($p = 0,182$) mais la faible puissance du test (32%) montre qu’une association pouvait difficilement être établie au vue des effectifs (51 plants positifs au PMWaV1 sur les 60 plants desséchés). A l’inverse, le **flétrissement** (*wilting*) est fortement associé à la présence du PMWaV1 ($p = 0,002$), PMWaV2 ($p < 0,001$) et PMWaV3 ($p < 0,001$) avec un calcul de puissance élevé (92 à 100%). Concernant **l’incurvation** (*curveling*), il existe une forte corrélation positive avec la présence du PMWaV1 ($p < 0,001$, puissance de 100%), avec 97 plants négatifs au virus, et ne présentant pas ce symptôme. Il est à noter que les plants qui sont incurvés et qui sont positifs au PMWaV2, PMWaV3 ou PBCOV sont tous également positifs au PMWaV1. La corrélation de chacun de ces virus seuls avec l’incurvation n’est pas significative. De faibles puissances (0 à 45%) liées à un effectif faible de plants présentant ce symptôme est par ailleurs constatée.

La présence des quatre virus est fortement corrélée au **jaunissement** (*yellowing*) mais de manière négative ($p < 0,002$). En absence de PMWaV1, on observe 65%

de plants avec du jaunissement contre 42% en sa présence ($p < 0,001$). Il en est de même pour les trois autres virus, résultats validés par une forte puissance (88 à 99%). De la même manière que pour le jaunissement, le **rougissement** (*reddening*) apparaît comme négativement corrélé avec la présence du PMWaV1 ($p = 0,022$, puissance de 74%), mais pas avec celle des autres virus. Il est important de noter que pour ces derniers, le calcul de la puissance montre une faible aptitude à détecter une différence (2 à 40%).

Si on compare le nombre de plants sans virus à ceux ayant au moins un virus, quel qu'il soit (**Table 3** dernière ligne), on observe une corrélation significative et positive pour le dessèchement ($p = 0,044$) avec une probabilité de 14% de dessécher en présence d'au moins un virus contre 3% sans virus, mais avec un calcul de puissance faible (28%). Alors que le flétrissement est corrélé de manière significative avec la présence des trois ampelovirus pris individuellement, il n'y a pas de relation entre la présence d'un virus, quel qu'il soit, et ce symptôme. Ce résultat pourrait être lié au fait que le PBCOV n'est pas corrélé à ce symptôme mais qu'il est présent dans la grande majorité des plants. Pour l'incurvation, une corrélation positive en présence d'au moins un virus est observé ($p = 0,028$) mais avec une puissance nulle, l'effectif trop faible de plants symptomatiques empêchant la validation du test.

Alors que l'ensemble de nos analyses ne nous a pas permis de mettre en évidence une association stricte entre la présence d'un ou des virus, et d'un ou des symptômes (*i.e.* l'ensemble des symptômes relevés ont été trouvés sur des plants sains et des plants infectés), des résultats sur la probabilité d'association d'un symptôme à la présence de virus peuvent être données. Globalement, les symptômes de **rougissement et de jaunissement** apparaissent comme négativement corrélés à la présence de virus, à l'inverse de ce qui est généralement évoqué dans le cas de la MWD. A l'opposé, trois symptômes particuliers, le **dessèchement, l'incurvation et le flétrissement**, sont largement associés à la présence de certains virus testés. Il est important de noter que si tous les virus pris individuellement ne sont pas significativement associés à chacun de ces symptômes, certaines paires virus/symptômes présentent des effectifs très faible rendant ainsi les tests peu puissants. Globalement, pour chaque comparaison dont la puissance du test dépassait 88%, une association hautement significative ($p < 0,01$) a été trouvée.

3.4 – Étude de l'intérêt de l'utilisation des VP

Afin d'étudier la dynamique de contamination des parcelles de VP, un suivi et une indexation des principaux virus sur plusieurs années et générations ont été réalisés. De manière générale, on remarque que seuls les virus PMWaV1 et PMWaV3 ont été détectés sur les VP, aucun plant n'étant infecté par le PMWaV2, le PBCOV ou le PBERV (**Table 1**). Deux lignées (L1 et L2) ont atteint la troisième génération (G3) de rejets issus de VP plantés au champ. Pour la lignée L1, un seul plant ne présentant aucun symptôme est détecté comme infecté par le PMWaV1 en G3. Pour la lignée L2, alors que l'ensemble des plants testés étaient négatifs pour la présence de virus en début de G3, soit après quatre ans de culture, un test réalisé 18 mois plus tard a montré la présence de PMWaV1 (N = 6 ; 19%) et de PMWaV3 (N = 9 ; 29%) avec un cas de co-infection. Il est important de noter que la lignée L2 se trouvait alors mitoyenne de parcelles d'ananas plantées avec des rejets traditionnels depuis deux ans, et que cette troisième génération a été replantée en 2020, sur une parcelle potentiellement contaminée par la culture précédente, au contraire de la lignée L1. Pour la lignée L3, on observe un gradient de contamination par PMWaV1 et PMWaV3, après trois ans de culture aux champs passant ainsi de 0 à 100% sur la même génération G1, accompagnés par des symptômes de flétrissement. Pour les lignées L4 et L5, les seules situées en altitude (440 m), ces mêmes virus sont également détectés toujours en G1 mais dès la première année de culture. Les plants de la lignée L4 présentaient tous les symptômes majoritairement décrits comme associés à la MWD, dont des incurvations des feuilles en septembre 2020. Pour les individus de la lignée L5, les symptômes notamment de flétrissement ont été notés ainsi que la présence de cochenilles en 2020, mais l'année suivante, aucun symptôme n'a été observé alors que les plants se trouvaient recouvert d'adventices. Il est important de noter ici que, hormis pour la lignée L1, la présence de cochenilles a été notée sur au moins une année pour chaque lignée.

3.5 – Évaluation de la présence d'autres virus récemment décrits sur ananas

Afin de déterminer si des virus autres que ceux testés par PCR et RT-PCR pouvaient être responsables de la survenue des symptômes notés lors de l'enquête, dix

plants présentant des symptômes sévères (fort et moyen) mais indexés négatifs aux virus ont été testés par séquençage haut-débit (**Table 2**). L'assemblage *de novo* des ~132,7 millions de paire de *reads* (~39,797 Mb) a permis d'obtenir 13 614 contigs (tailles variant de 74 à 6 384 pb). Une recherche de similarité avec des bases de données virales n'a pas révélé la présence de contigs viraux sur les dix plants testés. Toutefois, sur un des échantillons (noté E29), 13 *reads* non assemblés en contigs, présentant des similarités avec le PMWaV3, ont été détectés. Concernant les contrôles de processus utilisés, nommés alien 1 (bananier co-infecté avec des virus à ADN et ARN) et alien 2 (patate douce infectée avec un virus à ARN), des contigs ont été obtenus. Ceux de l'alien 1 présentaient des similarités avec le banana streak OL virus (NC_003381, N=15, soit 276 *reads*), le banana streak GF virus (NC_007002, N = 18, soit 688 *reads*), et le banana mild mosaic virus (NC_002729, N = 2, soit 9 501 *reads*), et pour l'alien 2, avec le sweet potato feathery mottle virus (NC_001841, N = 8, soit 3 188 *reads*). Conformément aux attendus, la nette détection de ces virus confirme l'aptitude de la méthode à détecter des virus de plante dans les conditions de notre essai. De plus, l'absence de *reads* ou contigs des virus caractéristiques de l'ananas sur les témoins alien, mais surtout l'absence de *reads* correspondant au virus des témoins aliens sur les plants d'ananas testés suggère l'absence de biais dans la manipulation. Un doute subsiste sur le statut de l'échantillon E29 pour lequel quelques *reads* de PMWaV3 ont été détectés alors même qu'il était négatif pour ce virus après RT-PCR. Le faible nombre de *reads* peut aussi être associé à une faible charge virale, sous le seuil de détection de la méthode RT-PCR. Toutefois, l'absence globale de détection de virus sur ces plants suggère l'absence en haute fréquence d'un virus autre que ceux testés dans notre étude. De manière importante, cela confirme la possibilité qu'un plant puisse présenter des symptômes de tout type et très marqué en absence d'infection virale.

4 – Discussion

État sanitaire des parcelles réunionnaises

Les taux de prévalence les plus élevés ont été obtenus pour le PBCOV (390 plants soit 87%) et le PMWaV1 (350 ; 78%), puis pour le PMWaV3 (200 ; 44%), et le

PMWaV2 (192 ; 43%). Des résultats similaires ont été rapportés en Australie, où le PMWaV1 (79%) et le PBCOV (76%) sont les plus répandus, suivis par le PMWaV3 (68%), et le PMWaV2 (moins de 25%) (Gambley, 2008; Gambley *et al.*, 2008b). D'autres travaux, en Colombie (Moreno *et al.*, 2023) et au Pérou (Carrasco-Lozano *et al.*, 2023), ont pour leur part rapporté une plus grande prévalence pour le PMWaV3 avec respectivement 93 et 65% de détection dans le matériel testé. Enfin, à Cuba (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2017), à Hawaï (Sether and Hu, 2002) et au Ghana (Asare-Bediako *et al.*, 2020), c'est le PMWaV2 qui est le virus le plus prévalent et a été décrit comme directement associé à la MWD. Concernant le PBCOV, sa prévalence est décrite à Hawaï avec un intervalle compris entre 34 et 68% (Sether *et al.*, 2012) et au Brésil avec 8% (Santos *et al.*, 2020). Les deux seules autres études présentant à la fois la prévalence des ampelovirus et des badnavirus sont celles qui ont été menées à Cuba (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2017) et en Australie (Gambley, 2008). Ces résultats de prévalence, contrastés d'un pays à l'autre, peuvent suggérer des dynamiques locales distinctes comme des histoires d'introduction virale différentes. Cela pourrait également souligner que la MWD est associée à un complexe viral dont la composition et la dynamique est variable d'un pays à l'autre et très probablement aussi dans le temps. Ce constat est en accord avec l'hétérogénéité des associations virus/symptômes et des facteurs déclenchant l'expression de la maladie qui ont été décrits dans la littérature.

Au-delà des prévalences virales élevées relevées au champ, un des constats notables issus de l'enquête est le fait d'observer une fréquence importante de co-infection. En effet, la multiplication végétative couramment observée chez les plantes, en particulier chez les espèces cultivées, est très favorable à l'accumulation et la perpétuation des virus, aboutissant fréquemment à une réduction considérable de la production végétale (Lee, 2015). D'ailleurs, les fréquences de co-infection élevées avec un grand nombre de combinaisons virales différentes suggèrent qu'il n'existe pas de mécanisme d'exclusion ou de compétition d'un virus par rapport à un autre sur les plants d'ananas testés, la présence d'un virus n'empêchant pas l'infection par un autre (**Table supplémentaire 4**).

Effet de synergie entre les virus

Dans la littérature les descriptions de synergies virale sont nombreuses, comme sur la tomate avec le tomato chlorosis virus (ToCV) et le tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Li *et al.*, 2021), ou encore pour la mosaïque de la papaye, causée par le papaya ringspot virus (PRSV) et le papaya mosaic virus (PapMV) (Vargas-Mejía *et al.*, 2020), mais seulement quand les plantes sont infectées d'abord par le PRSV, ou dans les plantes infectées simultanément par les deux virus (Chávez-Calvillo *et al.*, 2016). Plus proche des virus associés à la MWD, des cas de synergie ont été montrés pour d'autres complexes viraux avec des virus des genres *Ampelovirus* et des *Badnavirus* dans le cas de la maladie du tungro du riz (Hibino, 1983; Koganezawa, 1998), ou entre virus du genre *Vitivirus* dans le cas du complexe viral de l'enroulement des feuilles chez la vigne également connu sous le nom de grapevine leaf roll (GLR ; (Rowhani *et al.*, 2018)). Il a été constaté que ces interactions pouvaient avoir un impact significatif sur la sévérité des symptômes et la dynamique des populations virales (Moreno and López-Moya, 2020), et provoquer des symptômes plus graves que les infections causées par l'un ou l'autre des virus seul (Karyeija *et al.*, 2000; Redinbaugh and Stewart, 2018). Dans le cas de la MWD, il est encore difficile de déterminer si ces effets synergiques existent. S'il reste probable que l'augmentation du nombre de virus infectant une plante dégrade plus fortement son état sanitaire, cette hypothèse reste à être vérifiée et ne peut être tranchée sur la base de notre enquête. Des études en conditions contrôlées seraient nécessaires afin de vérifier le postulat de Koch dans un premier temps puis d'inoculer les virus en combinaison dans un second temps afin de valider ces hypothèses.

Évaluation d'une potentielle corrélation symptômes/virus

Hormis pour les VP, l'absence de corrélation claire entre l'itinéraire technique des parcelles et les typologies de symptômes, semble indiquer que les variables 'ITK' n'ont pas d'effet explicatif simple et majeur sur la maladie. En conséquence, nous nous sommes penchés sur les relation pouvant exister entre symptomatologie et présence des virus. Avant de discuter de la portée de ces résultats, il est d'abord important de noter que si nous avons pu caractériser les parcelles et en réaliser une typologie en termes de caractéristique et de conduite de culture, les

paramètres environnementaux, tel que la température, la pluviométrie ou l'ensoleillement n'ont pas été pris en compte. Il est largement possible qu'une partie des symptômes ou de la distribution des virus puisse être partiellement expliquée par ces paramètres.

Ceci étant dit, nos analyses ont montré une relation complexe entre la présence de virus et de symptômes. D'un côté, nous avons observé des plants symptomatiques (N = 36), essentiellement avec du flétrissement (N = 10), du jaunissement (N = 12), ou du rougissement (N = 13), mais pour lesquels aucun des quatre virus n'a été détecté. Et de l'autre côté, des plants asymptomatiques pour lesquels certains virus ont pu être détectés (N = 92). Si les analyses n'ont pas permis de mettre en évidence une association stricte entre présence de virus et de symptômes, certains symptômes sont ressortis comme plus caractéristiques de la MWD que d'autre. L'incurvation, le flétrissement et le dessèchement des feuilles semblent être les meilleurs indicateurs de la présence de virus. Quant au jaunissement et rougissement, ils sont négativement corrélés à la présence de virus.

Cette corrélation négative est pour le moins intrigante. En effet, des recherches ont démontré que dans certaines situations, les virus peuvent être des alliés pour les plantes en les aidant à déclencher des mécanismes de défense, renforçant ainsi leur résistance à certains types de stress, comme c'est le cas pour le turnip mosaic virus (TuMV) (González *et al.*, 2021) qui améliorent la tolérance au stress hydrique chez respectivement le tabac et *Arabidopsis thaliana*. D'autres études portent sur la capacité des plantes virosées à résister aux stress abiotiques tels que des températures extrêmes, des salinité élevées, ou encore des combinaisons de plusieurs stress (Prasad *et al.*, 2022). Certains auteurs évoquent le concept de mutualisme chez les plantes infectées par des virus, faisant référence à une relation bénéfique dans laquelle à la fois la plante hôte et le virus tirent des avantages de leur interaction (Hily *et al.*, 2016). Dans le cas de l'ananas, il est probable, que comme pour les exemples décrits plus haut, l'infection virale apporte un avantage permettant de limiter l'impact négatif de certains stress biotiques (Py *et al.*, 1984; Rohrbach and Johnson, 2003) ou abiotiques (Carter, 1945; Malézieux *et al.*, 2003; Py *et al.*, 1984), la ou les causes exacte(s) des jaunissements et rougissements des cultures d'ananas au champ à La Réunion reste(nt) à être déterminée(s).

Assainir les cultures d'ananas par l'utilisation de vitroplants

A l'instar des dispositifs mis en place sur la filière banane, l'utilisation de rejets issus de VP pourrait être une solution intéressante afin d'assainir les cultures d'ananas. Malgré un faible nombre de parcelles suivies, nos résultats suggèrent que globalement, les VP sont peu contaminés même après quatre années de cultures en plein champ. En effet, la prévalence des virus reste plus faible que dans les cultures traditionnelles avec jusqu'à 75% des plants qui restent indemne de virus (85 plants détectés positifs sur 348 VP suivis au total). De plus, les cultures issues de VP semblent avoir été contaminés par un nombre restreint de virus (PMWaV1 et PMWaV3). Ceci est notamment le cas pour les parcelles pour lesquelles l'itinéraire technique semble le moins adapté pour lutter contre la dispersion de la maladie (absence de rotation des cultures, proximité de parcelles d'ananas virosés). Alors que le PBCOV est le virus le plus prévalent sur les parcelles d'ananas surveillées, il n'a pas été détecté dans les parcelles issues de VP. Même si la portée de ce constat est limitée et qu'il devra être confirmé dans le temps, ce résultat est d'autant plus surprenant que la lignée L2, l'une de celle présentant un taux de contamination les plus élevés se trouvait être dans une parcelle mitoyenne d'une parcelle de rejets traditionnels infectés également par du PBCOV. Alors que la transmission des virus de la MWD est réalisée par cochenilles, très peu ont été observées dans notre étude. Leur rôle est de ce fait difficilement interprétable. Les cochenilles s'insérant fréquemment au niveau des aisselles des feuilles, et également au niveau des racines (Beardsley, 1959; McKenzie, 1967), il est possible que nos observations non destructives aient conduit à une sous-estimation de leur présence. Jusqu'à présent aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité de la transmission des virus des PMWaV ou des PBV chez l'ananas. Cependant nos données sur VP, malgré le faible nombre de parcelles suivies ayant une infection significative, suggèrent que le PMWaV1 et le PMWaV3 sont les virus les plus, ou les mieux transmis.

Il sera intéressant de poursuivre cette étude sur plusieurs générations et de multiplier le nombre de parcelles suivies et de plants collectés, afin de mieux évaluer l'impact des rejets sains issus de VP, sur la propagation des virus et l'émergence de nouveaux virus, en y associant des mesures de facteurs abiotiques comme la température et la pluviométrie. Une étude économique de coût/bénéfice/rendement menée en parallèle permettrait d'évaluer si les coûts de

mise en place de parcelles d'ananas à partir de VP à la place des rejets traditionnels seraient compensés par les bénéfices obtenus grâce à une réduction de l'impact de la MWD sur la production d'ananas.

Conclusion

Si les résultats des études précédentes menées sur la recherche d'association entre symptomatologie et virus montre des résultats contrastés, notre étude a permis de clarifier la symptomatologie de la MWD à La Réunion et souligne l'importance de l'infection virale dans l'aggravation de ces symptômes. Toutefois, l'absence de relation simple ainsi que la variabilité des résultats rapportés dans la littérature suggèrent des effets complexes associés aux interactions virus-virus ou virus-plante comme le cultivar ou à des facteurs locaux comme les conditions abiotiques. Malgré la difficulté de l'entreprise avec la nécessité de construire des clones agroinfectieux, la conduite de tests d'infection en conditions contrôlées semble être une étape nécessaire voir incontournable pour trancher sur l'implication de chacun des virus en infection simple ou mixte dans la MWD. Le fait que la MWD provoque des symptômes variables et généraux, dont les causes ne sont pas forcément liées à la présence d'un agent pathogène précis ou d'une association virale (PMWaV2, PMWaV1/PMWaV3, autres virus), et que d'autres facteurs peuvent générer ou accentuer ces symptômes comme des conditions biotiques (cochenilles, autres bioagresseurs), ou abiotiques (carence, stress hydrique, TIF), rend le diagnostic virologique de la maladie extrêmement compliqué. Aussi, le développement de tests de détection qui couvrent la diversité des virus permettrait de palier aux difficultés d'établir un diagnostic visuel au vu des risques importants de confusion avec des symptômes liés à d'autres facteurs. Enfin, l'utilisation des VP d'ananas pourrait avoir un intérêt dans l'assainissement de cette culture, si elle est associée à un itinéraire technique raisonné, accompagnée par l'adhésion des acteurs de la filière.

Figures et tableaux supplémentaires

Table supplémentaire 1 : Description générale des parcelles d'ananas visitées sur l'île de La Réunion, et présentation des variables liées à l'Itinéraire Technique (ITK) des parcelles, avec le nom de la parcelle (*Names of plots*), le nom de la ville (*Commune*), les coordonnées des sites collectés (*Longitude*), (*Latitude*) et (*Altitude*), l'âge de la parcelle au moment du prélèvement (*Age*), le stade de développement du plant d'ananas (*Stage of development*), le type de semence (*Type of seed*), la réalisation du Traitement d'Induction Florale (TIF), la rotation des parcelles (*Crop rotation*), le broyage des résidus de la culture précédente (*Destruction of residues by crushing*), la présence d'ananas en culture mitoyenne (*Adjoining crop in pineapple*), et l'historique de la parcelle l'année précédant la plantation sur la parcelle (*History of plot (n-1)*).

Names of plots	Commune	Longitude	Latitude	Altitude	Age (month)	Stage of development	Type of seed	TIF	Crop rotation	Destruction of residues by crushing	Adjoining crop in pineapple	History of plot (n-1)
P1	Le Tampon	55.544957	-21.288950	749	15	fruiting	rejet	no	no	yes	yes	pineapple
P2	Le Tampon	55.544654	-21.288369	747	15	fruiting	rejet	no	no	yes	yes	pineapple
P3	Saint Pierre	55.464625	-21.304450	151	14	fruiting	rejet	no	no	yes	no	pineapple
P4	Le Tampon	55.504750	-21.286628	440	19	fruiting	vitroplant	no	yes	no	no	fallow land
P5	Le Tampon	55.503930	-21.286666	440	18	fruiting	vitroplant	no	yes	no	no	fallow land
P6	Saint Benoit	55.715395	-21.106328	335	15	fruiting	rejet	yes	no	yes	yes	sugarcane
P7	Saint Benoit	55.725136	-21.124614	418	19	vegetatif	rejet	no	no	yes	yes	pineapple
P8	Sainte Suzanne	55.623979	-20.938533	124	14	fruiting	rejet	no	yes	no	no	pineapple
P9	Saint André	55.664416	-20.971945	116	14	fruiting	rejet	yes	no	yes	no	pineapple
P10	Sainte Rose	55.810091	-21.144547	107	12	fruiting	rejet	no	no	no	yes	pineapple
P11	Saint Leu	55.291582	-21.209875	105	14	fruiting	rejet	yes	no	no	no	pineapple
P12	Saint Leu	55.291184	-21.208444	100	14	fruiting	rejet	yes	no	yes	no	pineapple
P13	Saint Paul	55.280925	-21.069203	529	14	fruiting	rejet	yes	yes	no	no	market gardening
P14	Saint Denis	55.482017	-20.925685	345	20	fruiting	rejet	yes	no	no	yes	market gardening
P15	Saint Denis	55.476091	-20.928884	484	14	fruiting	rejet	no	no	yes	yes	pineapple

Table supplémentaire 2 : Effectif (*Percentage*) de présence des différents symptômes et des cochenilles pour chaque parcelle, et leur appartenance aux groupes issus de la classification selon l'ITK des parcelles. Le pourcentage a été calculé sur la base de l'effectif total (N = 30 par parcelle et N = 450 pour l'ensemble des 15 parcelles).

Plot	Dieback	Wilting	Yellowing	Curveling	Reddening	Mealybug	Cluster
P1	0 (0%)	1 (3%)	22 (73%)	0 (0%)	26 (87%)	0 (0%)	3
P2	0 (0%)	5 (17%)	18 (60%)	0 (0%)	25 (83%)	0 (0%)	3
P3	5 (17%)	7 (23%)	9 (30%)	0 (0%)	20 (67%)	0 (0%)	2
P4	3 (10%)	10 (33%)	10 (33%)	2 (7%)	15 (50%)	0 (0%)	1
P5	0 (0%)	9 (30%)	12 (40%)	0 (0%)	11 (37%)	11 (37%)	1
P6	10 (33%)	8 (27%)	24 (80%)	3 (10%)	28 (93%)	0 (0%)	3
P7	0 (0%)	0 (0%)	9 (30%)	7 (23%)	12 (40%)	0 (0%)	3
P8	0 (0%)	25 (83%)	8 (27%)	7 (23%)	25 (83%)	0 (0%)	2
P9	0 (0%)	14 (47%)	15 (50%)	5 (17%)	16 (53%)	0 (0%)	2
P10	15 (50%)	9 (30%)	15 (50%)	1 (3%)	29 (97%)	1 (3%)	2
P11	3 (10%)	26 (87%)	7 (23%)	1 (3%)	29 (97%)	0 (0%)	2
P12	1 (3%)	24 (80%)	6 (20%)	4 (13%)	24 (80%)	6 (20%)	2
P13	0 (0%)	2 (7%)	2 (7%)	1 (3%)	14 (47%)	0 (0%)	2
P14	16 (53%)	24 (80%)	9 (30%)	0 (0%)	24 (80%)	2 (7%)	3
P15	7 (23%)	9 (30%)	12 (40%)	1 (3%)	12 (40%)	0 (0%)	3
Total	60 (13%)	173 (38%)	178 (40%)	32 (7%)	310 (69%)	20 (4%)	

Table supplémentaire 3 : Effectif (*Percentage*) de plants infectés respectivement par le PMWaV1, 2, 3 et PBCOV dans chaque parcelle, et leur appartenance aux groupes issus de la classification selon l'ITK des parcelles. Le pourcentage a été calculé sur la base de l'effectif total (N = 30 par parcelle et N = 450 pour l'ensemble des 15 parcelles).

Plot	PMWaV1	PMWaV2	PMWaV3	PBCOV	Cluster
P1	10 (33%)	0 (0%)	2 (7%)	30 (100%)	3
P2	15 (50%)	14 (47%)	0 (0%)	30 (100%)	3
P3	22 (73%)	7 (23%)	4 (13%)	30 (100%)	2
P4	9 (30%)	0 (0%)	14 (47%)	0 (0%)	1
P5	7 (23%)	0 (0%)	2 (7%)	0 (0%)	1
P6	28 (93%)	25 (83%)	3 (10%)	30 (100%)	3
P7	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	30 (100%)	3
P8	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	2
P9	30 (100%)	0 (0%)	30 (100%)	30 (100%)	2
P10	23 (77%)	4 (13%)	20 (67%)	30 (100%)	2
P11	29 (97%)	29 (97%)	15 (50%)	30 (100%)	2
P12	29 (97%)	29 (97%)	11 (37%)	30 (100%)	2
P13	28 (93%)	0 (0%)	25 (83%)	30 (100%)	2
P14	30 (100%)	30 (100%)	29 (97%)	30 (100%)	3
P15	30 (100%)	24 (80%)	15 (50%)	30 (100%)	3
Total	350 (78%)	192 (43%)	200 (44%)	390 (87%)	

Table supplémentaire 4 : Probabilité de présence théorique des virus seuls et résultat du test exact de Fisher pour la comparaison des effectifs théoriques et observés des différentes combinaisons de virus. Les corrélations significatives sont indiquées par des étoiles (** : $p < 0,01$; * $p < 0,05$), et les non significatives par (NS). L'obtention d'un Odds-Ratio (OR) supérieur à 1 suggère une sur-représentation des effectifs observés par rapport à l'attendu. Plus l'OR est éloigné de 1, plus la sur-représentation est importante.

Virus	PMWaV1	PMWaV2	PMWaV3	PBCOV
Probabilité présence	0.778	0.427	0.444	0.867

Combinaison de virus	PMWaV1 et 2	PMWaV1 et 3	PMWaV1 et PBCOV	PMWaV2 et 3	PMWaV2 et PBCOV	PMWaV3 et PBCOV
Effectif theorique	149	156	303	85	166	173
Effectif observé	188	185	334	105	192	184
P value	0,004	0,027	0,014	0,060	0,044	0,248
Significativité	**	*	*	NS	*	NS
Odds-Ratio	1,45	1,31	1,396	1,306	1,27	1,107
% écart entre obs/théo	26,2	18,6	10,2	23,5	15,7	6,4

Chapitre 3

Apport de la métagénomique pour le diagnostic des virus de l'ananas



*Symptômes de la MWD sur le cultivar d'ananas Queen Victoria à La Réunion
(Source Delphine Massé)*

Le terme **métagénomique** a été employé pour la première fois en 1998 par Handelsman *et al.* (1998) pour décrire l'étude de l'ensemble du matériel génétique présent dans un échantillon complexe. Cependant, dès les années 1980, Pace *et al.* (1986) ont réalisé des expériences pionnières avec le clonage et le séquençage des amplicons des gènes des ARN ribosomiques (ARNr), à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement (Pace *et al.*, 1986). Par la suite, l'avènement du séquençage aléatoire ou *shotgun* et du **séquençage à haut débit**, ou **high throughput sequencing (HTS)** a considérablement augmenté la capacité de la métagénomique à détecter et caractériser des communautés microbiennes complexes, qu'elles soient cultivables ou non, et ce, sans *a priori* sur la population étudiée (New and Brito, 2020).

A partir de 2002, l'étude fondatrice de Breitbart *et al.* (2002), a marqué le début de l'application de la **métagénomique à la virologie** (Breitbart *et al.*, 2002). Les découvertes ultérieures ont entraîné des changements conceptuels majeurs dans la compréhension des origines, de la diversité et de l'ubiquité des virus (Koonin and Dolja, 2018). En effet, ces travaux ont abouti à un **changement de paradigme** : les virus ne sont plus exclusivement considérés comme des pathogènes mais comme des éléments essentiels des écosystèmes (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). En parallèle à ces découvertes, l'avalanche de nouvelles données virales a aussi conduit à accepter la **caractérisation de nouvelles espèces** de virus en se basant exclusivement sur des données métagénomiques, sans l'impérieuse nécessité d'observer des particules virales en microscopie électronique, et de valider le postulat de Koch (Simmonds *et al.*, 2017). L'ensemble de ces avancées technologiques majeures dans le domaine du séquençage haut débit ont permis l'élaboration de nouvelles approches de **diagnostic métagénomique sans a priori**, et leur utilisation dans le domaine des maladies virales des plantes (Massart *et al.*, 2019; Roossinck *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

Dans la cadre de l'étude du complexe viral potentiellement impliqué dans la MWD à La Réunion (**Chapitre 1**) et dans le monde (Gambley *et al.*, 2008b; Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014; Sether *et al.*, 2012), et en prenant en compte les récentes descriptions de nouvelles espèces virales de l'ananas (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b), nous avons entrepris d'évaluer l'utilisation de ces techniques de diagnostic

sans *a priori* à notre modèle. Le **second chapitre** de cette thèse a donc été consacré à **(i)** l'optimisation de la préparation des échantillons d'ananas avant séquençage HTS, **(ii)** l'application de plusieurs approches HTS sur un échantillon symptomatique d'ananas pour la caractérisation de sa communauté virale, puis **(iii)** la comparaison de ces approches pour la détection et la caractérisation des agents viraux.

La première partie de ce chapitre a consisté à comparer et évaluer différentes méthodes de conservation (à -80°C ou frais), de broyage (avec ou sans azote liquide), et des modalités d'extraction (différents kits commerciaux et protocoles), sur des échantillons foliaires d'ananas (**point 2 : Comment préparer des extraits d'ARN totaux d'ananas en vue du séquençage haut débit ?**). Cette étude nous a permis d'établir un protocole complet et optimisé, allant du traitement de l'échantillon lors de sa préparation au laboratoire, jusqu'à l'envoi de l'ARN total pour séquençage haut débit. Ce protocole peut être considéré comme un *proof of concept* qui pourrait être appliqué par la suite à d'autres plantes.

Ensuite, en seconde partie, différentes approches de préparation des acides nucléiques et de séquençage ont été testées : Parmi les approches HTS décrites dans la littérature, cinq approches ont été étudiées en collaboration avec des équipes expertes, à savoir le séquençage de : **1)** *virion-associated nucleic acids (VANA)*, (CIRAD UMR PHIM de Montpellier), **2)** *double-stranded RNA (dsRNA)*, (INRAE UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de Bordeaux), **3)** *ribosomal RNA depleted total RNA (rRNAd)*, (premières analyses réalisées à l'université de Gembloux Agro-Bio Tech à Liège) et **4)** *virus-derived small interfering RNA (siRNA)*, (INRAE Laboratoire de Pathologie Végétale de Montfavet). Pour ces quatre approches, les préparations d'acide nucléiques ont ensuite été séquencées sur plateforme Illumina. Nous avons également évalué l'intérêt du séquençage de **troisième génération (MinION, Oxford Nanopore Technologies)** (nommée *long reads* dans la suite du document) avec **5)** le séquençage de l'**ARN total** traité *via* un protocole basé sur une **sélection d'ARN polyadénylé**, réalisé en collaboration avec l'UMR PHIM. Si la majorité de ces techniques HTS sont déjà bien établit et utilisée en routine, l'approche *long reads*, plus récente et jamais appliquée sur les virus de l'ananas, a fait l'objet de tests supplémentaires d'optimisation (**point 3 :**

Optimisation de la proportion du nombre de reads viraux en vue du séquençage *long reads*).

Grâce à un effort de séquençage particulièrement important réalisé avec les méthodes **rRNA**d (ARN total ribodéplété, suivit par un séquençage **Illumina**) et **long reads** (construction des cDNA avec une amorce poly(T), séquencés au MinION), nous avons pu réaliser la caractérisation moléculaire des virus d'un plant prélevé à La Réunion et présentant les symptômes de la MWD (**point 4 : Caractérisation moléculaire et étude phylogénétique des virus de l'ananas à La Réunion**). Ces travaux ont permis la caractérisation génomique de **neuf espèces de phytovirus** présent en **co-infection**. Ces virus appartiennent à quatre familles virales différentes présentant des **génomés de nature variée** (virus à ARN avec génome polyadénylé ou non, et virus à ADN), caractérisés pour certains dans les **Articles 3** et **4**. En se basant sur les génomes viraux obtenus par les cinq approches HTS, nous avons évalué la capacité de chacune de ces méthodes à détecter et à caractériser les différents virus identifiés (**point 5 : Analyses comparative de cinq techniques de séquençage à haut débit**, et **Article 4**). Nos résultats soulignent l'intérêt de **combiner plusieurs approches HTS** pour caractériser le virome de l'ananas.

1 - Matériels et méthodes

Échantillons de plant d'ananas

Les analyses ont été effectuées sur des feuilles de quatre plants symptomatiques. Deux de ces plants (notés P4 et P8) ont été collectés entier sur la station expérimentale du Cirad de Bassin Plat à Saint Pierre en 2016, et ont été conservés en serre tout au long des expérimentations, afin de pouvoir prélever de manière récurrente du matériel frais. Pour ces plants, le prélèvement d'une jeune feuille et sa découpe en morceaux d'environ 0,5 cm² se faisait avant chaque expérimentation. Deux autres plants (notés 16/1 et 16/2) ont été collectés sur le même site et la même année que les échantillons précédents. Pour chacun de ces deux plants, une jeune feuille et une feuille plus ancienne ont été prélevées, puis coupées en morceaux, homogénéisées, puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Les échantillons analysés sont du cultivar 'MD2' pour le plant P4, et 'Queen Victoria' pour les autres plants.

Broyage

Avant extraction des acides nucléiques, 100 mg de feuilles d'ananas découpées ont été broyées soit au mortier avec de l'azote liquide, soit à l'aide d'un broyeur à billes Homex (Bioreba) dans un sachet en polyéthylène grillagé de type ELISA, contenant le tampon d'extraction adapté à la méthode d'extraction employée par la suite.

Extraction des acides nucléiques

Six modalités d'extraction (**Tableau 4**) ont été choisies afin d'étudier une large gamme de critères, comme le principe d'extraction (solvant, colonne de silice, séparation par billes magnétiques), le coût (de 3 à 12€ par échantillon) ou encore la cible d'acides nucléiques extraits (ARN total, mélange d'ADN et d'ARN, ou petits ARN). Pour chaque modalité, les acides nucléiques ont été extraits selon les recommandations des fournisseurs.

Tableau 4: Principes et cibles des six modalités d'extractions d'acide nucléiques testés.

Kit d'extraction/Tampon (Fournisseur)	Principe	Cible
PureLink miRNA Isolation Kit (Invitrogen)	Colonne de silice	petits ARN
RNeasy PowerPlant kit (Qiagen)	Colonne de silice	ARN total
RNeasy Plant mini kit (Qiagen)	Colonne de silice	ARN total
Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel)	Colonne de silice	ARN total
PureLink Plant RNA reagent (Ambion)	Solvant	ARN total
InnuPREP Virus DNA/RNA kit (Analytic Jena)	Bille magnétique	ARN et ADN

Une étape supplémentaire de *DNase* (*DNase I*, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) a été réalisée après l'extraction, sauf pour les extractions avec le réactif *PureLink* et le kit *PureLink miRNA*, pour lesquels cette étape était déjà incluse dans le protocole du fournisseur. Les concentrations des extraits des ARN ont été obtenues avec le kit *RNA ScreenTape Assay* sur l'appareil *TapeStation* (Agilent Technologies, Californie, États-Unis). L'intégrité des ARN extraits a été évaluée sur la base de la valeur du RIN (*RNA Integrity Number*), obtenue à l'aide d'une puce Agilent RNA 6000 Pico. Les aliquots d'ARN totaux ont été conservés à -80°C avant utilisation.

Séquençage haut débit

Deux familles de séquençage haut débit ont été employées lors de cette étude avec du séquençage *short reads* Illumina pour les stratégies VANA, dsRNA, rRNA et siRNA, et du séquençage *long reads* Nanopore (MinION) pour la stratégie cDNA polyadénylé.

Les séquençages *short reads* ont été réalisés par des prestataires externes. Pour l'approche rRNA, après précipitation de l'ARN avec de l'éthanol (2,5 Volume à 95%) et de l'acétate de sodium (0,1 M), couplée au glycogène (0,2 µg/µL), les échantillons ont été expédiés chez Genewiz (USA) pour un premier *run* de séquençage, et au *GIGA-Genomics Facility* (Université de Liège, Belgique), pour un second *run* de séquençage. Pour le premier *run*, les librairies ont été construites à l'aide du kit de ribodéplétion *Ribozero plant rRNA depletion* et du kit *TruSeq Stranded RNA library prep kit* (Illumina, San Diego, CA, États-Unis), suivit par un séquençage de 2x150pb en paire (*paired-end*) sur un séquenceur Illumina NovaSeq. Pour le second séquençage, le kit *RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq* (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France) a été utilisé. La librairie de cDNA a été obtenue *via* le kit *TruSeq Stranded RNA library prep* (Illumina, San Diego, CA, US), et séquencée sur une plateforme Illumina NextSeq500 (2x150pb). La préparation des échantillons et le séquençage ont été réalisés comme décrit par Marais *et al.*, (2018) pour le dsRNA, par Moubset *et al.*, (2022), pour le VANA, et par Verdin *et al.*, pour les siRNA (2017).

Dans le cas du séquençage *long reads*, la construction des librairies et le séquençage ont été réalisés localement. Dans le but d'améliorer le séquençage viral, nous avons tenté d'optimiser le protocole préconisé par le fournisseur en **1)** combinant des étapes de ribodéplétion et de polyadénylation au préalable de la construction de la librairie, et **2)** améliorant l'étape de rétrotranscription ou transcription inverse (RT). La ribodéplétion des ARNr a été réalisée sur 2 µg d'ARN total à l'aide du kit *RiboMinus Plant pour RNA-Seq* (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France), et la polyadénylation sur 1 µg d'ARN total, en suivant le protocole *Poly(A) Tailing of RNA using E. coli Poly(A) Polymerase* (NEB, New England Biolabs, USA). De plus, en alternative à la transcriptase inverse *SuperScript IV* (Invitrogen)

préconisée par Oxford Nanopore, une seconde enzyme *Maxima H Minus* (ThermoScientific) a été testée selon les préconisations du fabricant. Pour la construction des librairies, 50 ng d'ARN total de chaque échantillon a été traité en triplicat avec le kit cDNA-PCR *barcoding* (SQK-PCB109) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom) (**Figure 45**). Des billes *Sera-Mag Select* (Cytiva, Washington, US) ont été utilisées pour la purification des ADN lors des étapes de construction des librairies.

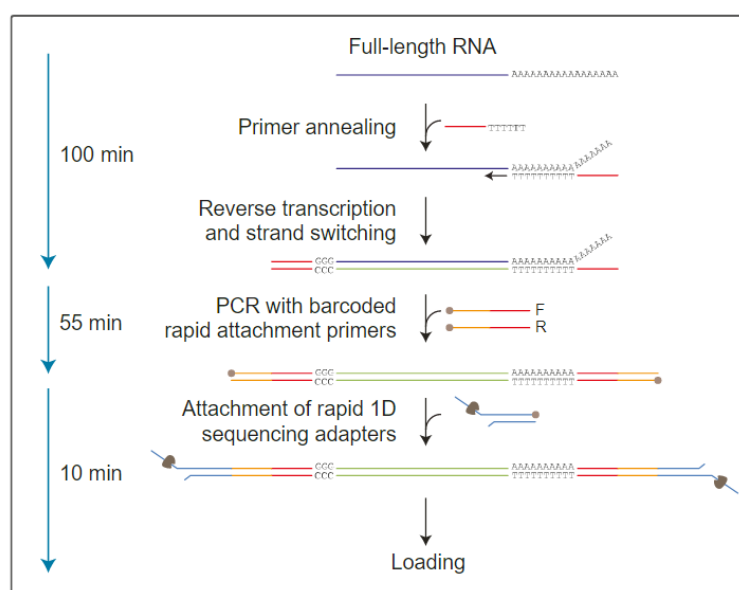


Figure 45: Protocole de préparation de l'ARN *via* le kit cDNA-PCR barcoding (SQK-PCB109) de chez Oxford Nanopore Technologies utilisé pour le séquençage au MinION de l'ARN total d'ananas (ONT, version révisée en octobre 2019).

Pour la caractérisation moléculaire des virus (**point 4**), et l'analyse comparative des cinq approches de séquençage (**point 5**), deux analyses distinctes ont été réalisées et décrites dans l'**Article 4**. Succinctement, pour le premier séquençage, les échantillons ont été traités en quadruplicat en utilisant différentes étiquettes moléculaires (*barcodes*). Les librairies ont été préparées avec des concentrations équimolaires de produits de chaque répliat, après quantification à l'aide du *Kit Qubit dsDNA Broad Range Assay* sur le *Qubit Fluorometer 2.0* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US). Pour le second séquençage, la librairie a été préparée avec un seul échantillon. Dans les deux cas, les librairies ont été chargées sur des *flowcells* FLO-MIN 106D, R9.4.1. Le séquençage a été effectué avec un

appareil MinION, et contrôlé à l'aide du logiciel MinKNOW v21.11.8 pendant 28 et 16 heures respectivement.

Analyses des données HTS

Pour les *short reads*, les séquences brutes obtenues par les différentes stratégies ont été traitées sur le serveur Galaxy de l'INRAE (<https://migale.inrae.fr>). Pour le rRNA, le démultiplexage et le contrôle qualité des *reads* (*i.e.* lectures d'un fragment de séquences nucléotidiques) ont été effectués à l'aide de Trimmomatic v0.38.1 (Bolger *et al.*, 2014). Après l'élimination des adaptateurs et des étiquettes, le contrôle qualité a été réalisé en utilisant les paramètres par défaut (*reads* sélectionnés avec une qualité minimum de 25 et une taille de 80nt). Pour les autres stratégies *short reads*, les analyses de données ont été effectuées telles que décrites par Marais *et al.*, (2018) pour le dsRNA, et par Moubset *et al.*, (2022), pour le VANA. Pour les siRNA, les analyses ont été réalisées à l'aide de VirusDetect (Zheng *et al.*, 2017), en utilisant la base de données de GenBank v238 (août 2020). Dans le cas des *long reads*, l'appel des bases nucléotidiques (*basecalling*) a été réalisé à l'aide de Guppy v6.0.1 selon le modèle de *High accuracy*. Les *reads* passant le filtre de qualité par défaut (score PHRED moyen de 7) ont ensuite été traitées avec Porechop v0.2.4 (Wick *et al.*, 2017) pour l'élimination des adaptateurs et le démultiplexage (*i.e.* redistribution des *reads* selon les échantillons). Les *reads* d'une longueur inférieure à 80 nucléotides ont été éliminés à l'aide de NanoFilt v0.1.0 (De Coster *et al.*, 2018).

Un co-assemblage *de novo* des *short reads* rRNA et *long reads*, les deux approches pour lesquelles un effort de séquençage plus important a été réalisé, a alors été effectué à l'aide de SPAdes v3.13 en utilisant les paramètres par défaut sur la plateforme bio-informatique SouthGreen (**Article 4**). Les contigs obtenus ont été assemblés en contigs nommés de C-A à C-F avec EGAssembler (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006) avec le service en ligne (<https://www.genome.jp/tools/egassembler>). Ensuite, après classification des contigs par BLASTx contre une base de donnée de séquences virales obtenue *via* GenBank en février 2020, les statistiques de couverture de chacun des contigs viraux des *short* et *long reads* ont été obtenues par alignement des *reads* respectivement à l'aide de BWA MEM v0.7.017.1 (Li and Durbin, 2009) et minimap2 v2.17 (Li, 2018). La fraction de *reads* correspondant au génomes et aux ARN

ribosomiques de l'ananas a été obtenue par alignement contre le génome de référence GCF_001540865.1 téléchargé depuis GenBank.

Caractérisation des virus de plantes

Pour les génomes de virus qui n'ont pas été assemblés de manière complète, une analyse directe des *long reads* a été réalisée afin de rechercher les fractions manquantes du génome, notamment au niveau des extrémités 5' et 3'. En parallèle, dans le cas de virus à ARN, des amplifications rapides d'extrémités de cDNA par réaction en chaîne par polymérase ou *rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction* (RACE PCR) ont été réalisées en suivant les préconisations du fournisseur du kit SMARTer RACE 5'/3' (Takara, Beijing, China). Les génomes viraux ainsi complétés ont été annotés à l'aide des outils disponibles sous le logiciel Geneious Prime soft v2021.1.1 (<https://www.geneious.com>). Les séquences des virus caractérisés ont été alignées en utilisant MAFFT v7.450 (Katoh *et al.*, 2002; Katoh and Standley, 2013) avec les représentants de chacun des genres viraux identifiés tel qu'obtenus sous GenBank en mars 2023. Des arbres phylogénétiques ont alors été construits à l'aide de FastTree v2.1.11 (Price *et al.*, 2009).

Détection des virus

Afin de confirmer la présence des virus obtenus par séquençage HTS, des tests PCR et RT-PCR ont été réalisés. Les amorces spécifiques décrites par Gambley *et al.*, (2008b) pour la détection du PMWaV1 et 3, et par Sether *et al.*, (2005) pour la détection du PMWaV2 ont été optimisées *via* une RT-PCR multiplexe (**Article 4**). D'autres amorces et RT-PCR simplexes ont été utilisées afin de confirmer la présence du PMWaV5, 6, 7, PinVA, PSVA-RNA1 et RNA2 (**Annexe 1** et **Article 4**). Les amorces développées par Gambley *et al.* ont été utilisées pour détecter le PBCOV par PCR (Gambley *et al.*, 2008a).

2 – Comment préparer des extraits d'ARN totaux d'ananas en vue du séquençage haut débit ?

En premier lieu, mes travaux de recherche ont porté sur le processus de préparation de l'échantillon foliaire d'ananas, afin d'aboutir à des extraits d'acides nucléiques en quantité et qualité adaptées aux séquençages *short* et *long reads*.

Plusieurs études ont montré que le broyage dans l'azote liquide permettait d'obtenir un rendement élevé, et de préserver l'intégrité de l'ARN (Hazman *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2015). Cependant, l'intermittence de la disponibilité d'azote liquide dans notre laboratoire nous a poussé à évaluer l'importance de son utilisation dans le processus d'extraction, que ce soit sur du matériel frais, ou sur du matériel congelé. Étant donné l'utilisation d'un grand nombre de kits et de méthodes d'extraction différents au laboratoire, il était également nécessaire d'évaluer leur efficacité spécifiquement pour l'extraction des ARN d'ananas. Cette partie méthodologique de ma thèse a donc consisté à comparer **(i)** six modalités d'extraction (présentées dans le **Tableau 4**), **(ii)** deux méthodes de conservation des échantillons foliaires (frais, ou à -80°C), et **(iii)** deux méthodes de broyage (au froid avec de l'azote liquide, ou à température ambiante).

2.1 - Comparaison de six modalités d'extraction d'ARN

Six modalités d'extraction des ARN totaux ont été évaluées dont cinq kits commerciaux (RNeasy Plant mini kit - Qiagen, Nucleospin RNA kit - Macherey Nagel, PureLink miRNA Isolation Kit - Invitrogen, InnuPREP Virus DNA/RNA kit - Analytic Jena, RNeasy PowerPlant kit - Qiagen), et un solvant organique (PureLink Plant RNA reagent - Ambion) permettant d'extraire aussi l'ARN total (**Tableau 4**). L'ARN des échantillons frais P4 et P8 (N=2, répétition = 1) a été extrait selon deux types de broyage 'azote' ou 'sachet' présentés dans le **point 1**, en suivant les préconisations des fournisseurs. Pour chaque modalité d'extraction (en abscisse), l'indice d'intégrité de l'ARN RIN (en jaune) et le rendement (en vert) ont été mesurés pour les échantillons P4 (**Figure 46 A**) et P8 (**Figure 46 B**).

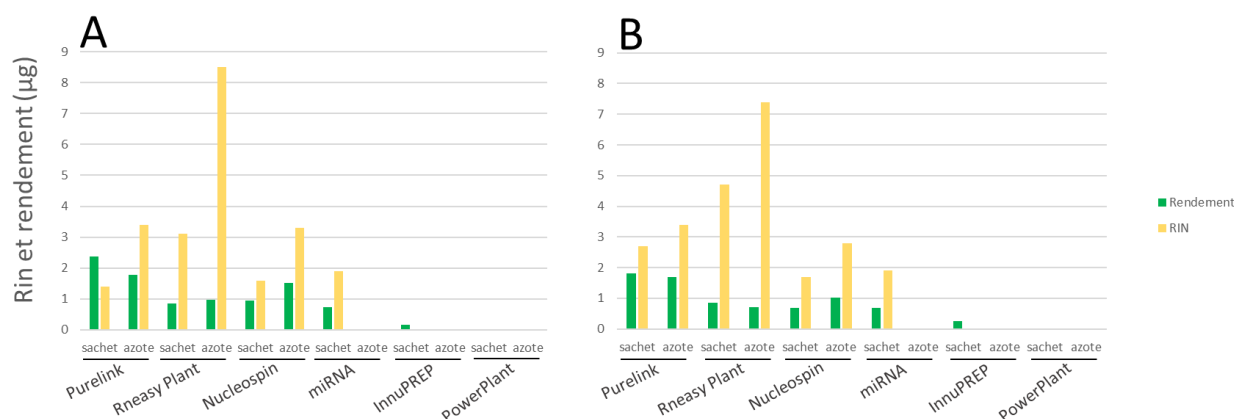


Figure 46 : Comparaison du rendement (en vert, mesuré en µg) et de la qualité (en jaune, noté RIN) des ARN, en fonction du mode de broyage (sachet ou azote), et des kits d'extraction (en abscisse), pour les échantillons (A) P4, et (B) P8.

De très larges variations de rendement et de qualité ont été notées en fonction du kit utilisé. Dans l'ensemble, un broyage sous azote liquide donne de meilleurs résultats en quantité et en qualité d'ARN. Le kit d'extraction RNeasy Plant (Qiagen) associé à un broyage sous azote liquide a permis d'obtenir un ARN de très bonne qualité avec un RIN de 8,5 (**Figure 46 A et B**). Dans le cas du broyage en sachet, c'est aussi ce kit qui a permis d'obtenir le matériel de meilleure qualité, élément crucial pour le séquençage haut-débit. Les quantités d'ARN obtenues, de l'ordre du microgramme, sont elles aussi compatibles avec les préconisations générales pour la construction de bibliothèques de séquençage. Alors que les rendements d'extractions se sont avérés supérieurs, le kit d'extraction Nucleospin RNA Plus (Macherey Nagel), et le protocole utilisant le PureLink Plant RNA reagent (Ambion) n'ont pas permis d'atteindre des ARN de qualité équivalente à l'usage du kit RNeasy Plant (Qiagen), malgré un broyage sous azote liquide (**Figure 46 A et B**). L'utilisation des kits RNeasy PowerPlant (Qiagen), InnuPREP (Analytic Jena) ou miRNA (Invitrogen) n'a pas fourni des quantités suffisantes d'ARN pour réaliser le dosage ou l'évaluation de la qualité (quantités d'ARN inférieures au seuil de détection du photomètre de 25 ng/µL). Globalement, les mêmes tendances ont été observées pour les deux échantillons P4 et P8. Au vu de nos résultats, le **kit RNeasy Plant** a été sélectionné comme la meilleure stratégie pour la purification des **ARN totaux d'ananas**.

2.2 – Effet de la conservation à -80°C sur l'extraction d'ARN

Afin de déterminer l'impact de la conservation à -80°C ou à +4°C des échantillons foliaires d'ananas, des extractions à l'aide du kit RNeasy Plant (Qiagen) ont été réalisées sur des échantillons frais (N=2, répétition = 1), ou conservés à -80°C (N=2, répétition = 3). Le broyage a été effectué soit au mortier avec de l'azote liquide (**Figure 47**, en bleu), soit en sachet de type ELISA (**Figure 47**, en orange).

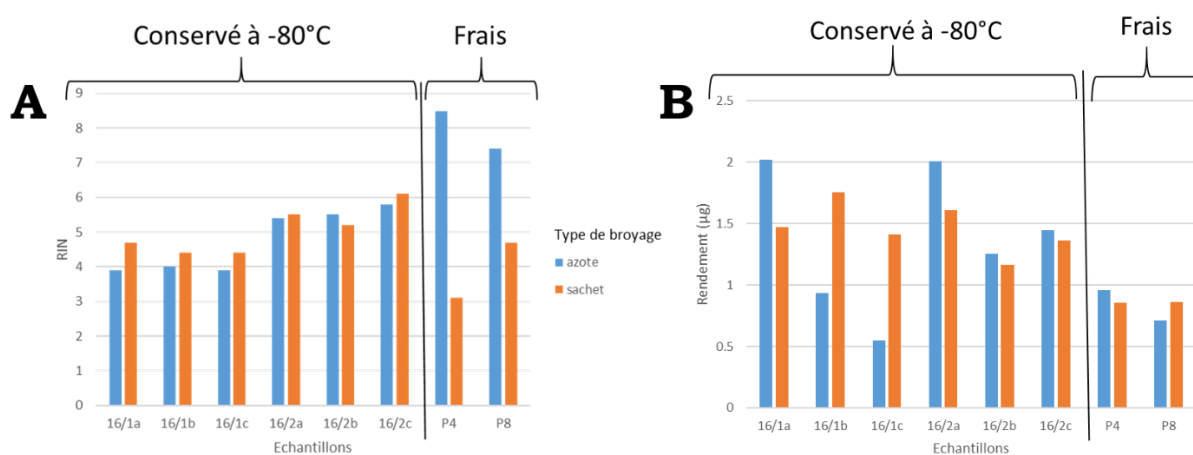


Figure 47 : Mesure de (A) la qualité (estimée par la mesure du RIN), et (B) la quantité (rendement) de l'ARN total extrait, selon le type de broyage à l'azote liquide (bleu) ou au broyeur à bille en sachet type ELISA (orange), et selon le mode de conservation de l'échantillon (-80°C ou +4°C), après une extraction au kit RNeasy Plant (Qiagen).

La comparaison de la qualité des ARN selon le type de conservation et le type de broyage montre que le broyage au mortier avec de l'azote liquide, considéré comme le *gold standard* pour la préservation de l'intégrité des ARN, est la méthode à privilégier lorsque l'on travaille avec du matériel frais (RIN de 7,5 à 8,5), soit nettement supérieur aux valeurs obtenues après broyage en sachet (3,1 à 4,7) (**Figure 47 A**). Dans le cas de matériel conservé à -80°C (ici réalisé sur des échantillons différents que ceux testés en frais), le type de broyage ne semble pas avoir d'influence sur la qualité des ARN extraits, et on observe des RIN équivalents pour chaque échantillon quel que soit le type de broyage. Ces valeurs de RIN (3,9 à 6,1) restent toutefois inférieures aux résultats obtenus sur échantillons frais broyés à l'azote liquide. Concernant le rendement, si en moyenne, ceux-ci sont équivalents en partant de matériel frais, entre broyage en sachet (0,9 µg) ou à l'azote (0,9 µg), on observe de larges variations après extraction sur matériel

congelé (de 0,5 à 2 µg) (**Figure 47 B**). Le manque de répétition ne permet toutefois pas de conclure sur l'origine de ces variations.

Pour la suite de nos travaux, nous avons donc privilégié le protocole d'extraction des ARN totaux réalisé à partir de matériel **frais** et broyé à **l'azote liquide**, alors que le matériel conservé à -80°C serait extrait en **sachet**.

3 – Optimisation de la proportion du nombre de reads viraux en vue du séquençage *long reads*

Les premières analyses de séquençage *long reads* ont montré que la majorité des *reads* séquencés représentait, comme attendu, des séquences du génome de l'ananas (~90%) avec une proportion d'ARNr d'environ 7%, et moins de 3% de séquences virales sur la totalité des séquences obtenues (**Figure 48**).

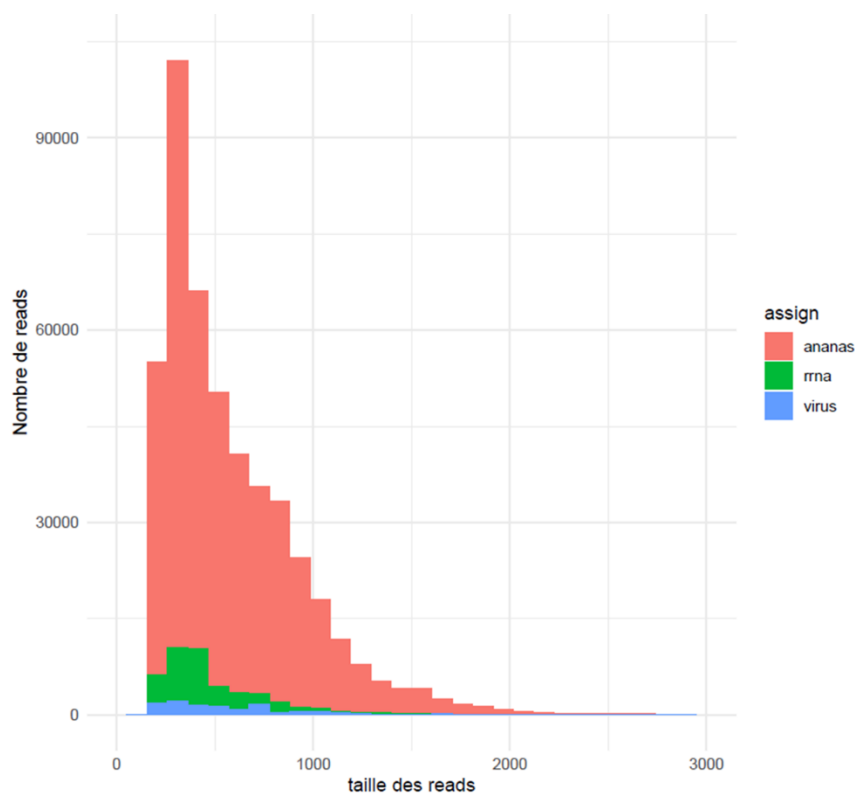


Figure 48 : Assignment des *reads* sur le génome de l'ananas (en rose, sans les ARN ribosomiques), les ARN ribosomiques de l'ananas (en vert) et les ARN viraux (en bleu) en fonction de la taille des *reads*, après utilisation du kit cDNA-PCR barcoding, et séquençage *long reads* au MinION selon les préconisations d'ONT.

Aussi, il est apparu qu’il existait une grande hétérogénéité de couverture des génomes viraux séquencés. Nous avons donc tenté d’optimiser la préparation des ARN afin d’augmenter la proportion d’ARN viral séquencé et d’obtenir une plus grande homogénéité dans leur couverture.

Il est important de souligner que le kit de préparation des bibliothèques *cDNA-PCR barcoding* pour le séquençage *long reads* est recommandé pour les ARN polyadénylés. Cependant, parmi les virus identifiés sur ananas, un grand nombre ne présente pas cette caractéristique, tels que les virus appartenant au genre *Ampelovirus* (virus à ARN non polyadénylé), ou au genre *Badnavirus* (virus à ADN double brin circulaire).

Nous avons donc testé trois modalités de préparation de l’ARN total afin d’optimiser le séquençage des virus de l’ananas : **(i)** polyadénylation des ARN extraits, **(ii)** ribodéplétion des ARN grâce au kit *RiboMinus Plant kit*, et **(iii)** combinaison de la ribodéplétion et de la polyadénylation. Pour chacune de ces trois modalités, trois répétitions ont été réalisées à partir de l’échantillon 16/1, et comparées à la modalité classique de préparation des ARN totaux recommandée par ONT **(Tableau 5)**.

Tableau 5 : Caractéristiques et assignations des reads obtenus après séquençage au MinION selon les différentes modalités de préparation des ARN.

Préparation	Répétition	Données brutes					Données après trimming et filtre								
		Nombre reads	Nombre bases	Longueur maximale (nt)	Longueur moyenne reads	Nombre reads	Nombre bases	Longueur maximale (nt)	Longueur moyenne reads	Nombre reads assigné ananas	%	Nombre reads assigné ARNr	%	Nombre reads assigné virus	%
ARN_total	Rep1	602 909	313 029 596	8 555	519.2	470 019	203 537 565	8 401	433	423 244	90.0	32 541	6.9	11 822	2.5
ARN_total	Rep2	125 538	72 317 090	7 565	576.1	96 858	48 177 201	7 454	497.4	87 132	90.0	7 801	8.1	2 318	2.4
ARN_total	Rep3	174 845	97 617 892	17 056	558.3	138 783	65 607 640	5 462	472.7	127 433	91.8	8 079	5.8	3 172	2.3
ARN_PolyA	Rep1	380 694	141 066 559	4 275	370.6	275 475	72 609 881	4 174	263.6	105 959	38.5	100 166	36.4	4 459	1.6
ARN_PolyA	Rep2	366 554	136 273 856	2 993	371.8	260 008	68 933 777	2 583	265.1	104 947	40.4	99 774	38.4	4 277	1.6
ARN_PolyA	Rep3	185 888	69 949 662	15 411	376.3	137 901	36 390 021	2 640	263.9	54 003	39.2	53 660	38.9	2 159	1.6
ARN_ribo	Rep1	267 730	112 765 706	3 214	421.2	199 572	65 911 666	2 969	330.3	190 115	95.3	8 152	4.1	4 809	2.4
ARN_ribo	Rep2	98 447	46 444 982	3 234	471.8	76 331	29 351 810	2 920	384.5	73 031	95.7	2 267	3.0	1 861	2.4
ARN_ribo	Rep3	91 827	42 600 924	3 585	463.9	71 794	26 608 084	3 428	370.6	67 595	94.2	2 805	3.9	1 755	2.4
ARN_ribo_polyA	Rep1	146 734	56 446 553	3 174	384.7	107 796	29 766 854	2 818	276.1	69 347	64.3	20 454	19.0	2 425	2.2
ARN_ribo_polyA	Rep2	298 729	115 279 109	4 701	385.9	209 342	60 594 239	3 246	289.5	144 899	69.2	36 152	17.3	4 887	2.3
ARN_ribo_polyA	Rep3	97 068	34 674 165	2 962	357.2	69 719	17 237 326	2 811	247.2	36 139	51.8	18 142	26.0	1 259	1.8

Tout d’abord, on constate que l’ajout de l’étape de ribodéplétion a permis de diminuer légèrement en moyenne le pourcentage d’ARNr de 7 à 4%, mais sans pour autant augmenter la proportion de *reads* viraux. Comme attendu, l’ajout d’une étape de polyadénylation seule a comme effet principal l’enrichissement de

la fraction d'ARNr dans le pool de séquences obtenus passant alors à 38% en moyenne. Si cette modalité semble indiquer le bon fonctionnement de la polyadénylation, elle montre aussi la nécessité de prévoir en amont de celle-ci, une étape de ribodéplétion. Le cumul de la ribodéplétion suivi de la polyadénylation n'a pas abouti aux résultats escomptés avec encore une fois un enrichissement en ARNr (moyenne de 21%), allant à l'encontre de l'objectif initial d'enrichissement en ARN viraux. Aucune des trois modalités testées n'a permis d'améliorer la proportion de *reads* viraux en comparaison de la modalité classique (moyenne de 2,4%), ou de la couverture de leur génome (donnée non détaillées), nous amenant à conserver le **protocole** tel que **préconisé** par le fabricant.

4 – Caractérisation moléculaire et étude phylogénétique des virus de l'ananas à La Réunion

Afin de caractériser les virus de l'ananas, nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur deux approches à savoir **(i)** l'extraction d'ARN total ribodéplété (**rRNAd**) suivit par un séquençage *short reads* en Illumina, et **(ii)** l'extraction d'ARN total suivit par un protocole basé sur une sélection d'ARN polyadénylé, puis un séquençage au MinION (**long reads**). La première approche par **rRNAd** est reconnue comme une méthode puissante et polyvalente pour l'analyse des viromes de plantes en raison de sa haute sensibilité, du faible taux d'erreur de séquençage, et de sa grande capacité de traitement (Kutnjak *et al.*, 2021; Villamor *et al.*, 2019). La seconde approche par *long reads* permet d'obtenir des données brutes plus rapidement. La longueur des *reads* plus importante que celle des autres technologies de séquençage, et la détection en temps réel des virus présents dans l'échantillon, sont également des atouts pour la caractérisation virale, et l'assemblage de génomes complets (Zhang *et al.*, 2021). L'objectif a été dans un premier temps d'obtenir une description exhaustive du **virome** associé à notre échantillon d'ananas 16/1, puis d'estimer ensuite, la **capacité** de chacune des **méthodes** à répondre à un besoin en **diagnostic** et en **caractérisation des génomes viraux**, quelle que soit leur nature (**ADN ou ARN**).

4.1 – Identification de virus connus et nouveaux sur l’ananas

Après le co-assemblage des données de séquençage Illumina (**rRNA**d, *short reads*) et MinION (*long reads*) à partir de l'échantillon symptomatique d'ananas 16/1, un total de 105 834 contigs a été obtenu (tailles allant de 77 à 56 804 pb). Une recherche de similarité avec une base de donnée virale a révélé la présence de dix contigs (nommés Contig-A à Contig-I), de taille allant de ~4 à 18 kb, et présentant des similarités avec des virus du genre *Vitivirus* (**Article 3**), *Ampelovirus* (**Article 4**), *Badnavirus* (**point 4.2**) et *Sadwavirus* (**point 4.3**).

Un des avantages du séquençage *long reads* a été de rechercher la présence de la séquence de la *strand-switching primer* (SSP) et d'une queue poly-A, permettant d'identifier les extrémités 5' et 3' de chaque contig viral assemblé. Grâce à cette méthode, nous avons pu identifier avec certitude les extrémités 5' de cinq des six ampélovirus (à l'exception de PMWaV5), du PBCOV, du PinVA et du PSAV RNA1. Concernant l'extrémités 3', la même approche a permis d'obtenir les séquences terminales du PMWaV1, PMWaV7, PBCOV, PinVA et PSVA RNA2.

En utilisant la RACE PCR en parallèle avec des amorces personnalisées conçues sur la base des séquences de chaque contig, les extrémités 5' des séquences des PMWaV5, 6, 7, PSVA RNA2, et l'extrémité 3' du PMWaV7 ont été confirmées. En revanche, nos tentatives pour obtenir les autres extrémités sont restées infructueuses. Ainsi, la **combinaison** des deux approches a permis d'assembler les **génomés complets des** PMWaV1, PMWaV7, PinVA et PBCOV.

Les analyses du contig présentant une similarité avec des virus du genre *Vitivirus* (famille des *Betaflexiviridae*) ont permis la description d'une nouvelle espèce nommé pineapple virus A (PinVA), nouvellement décrit sur ananas (**Article 3**). L'isolat caractérisé dans notre étude présente un génome de 6 757 pb codant pour cinq ORF. Les recherches de similarité sur le gène codant pour la protéine associée à la réplication ou *replication associated protein* (RAP) ont montré sa proximité avec le mint virus 2 avec 59,1% de similarité nucléotidique (nt) et 36,3% de similarité en acide aminée (aa). Pour le gène codant pour la protéine de capsid ou *coat protein* (CP), elle présente la plus importante similarité avec le blueberry green mosaic associated virus (55,3% nt) et le grapevine virus G (44,6% aa).

Dans le cas des contigs présentant de similarités avec des virus du genre *Ampelovirus*, nos analyses ont permis de confirmer la présence des trois espèces PMWaV1, 2 et 3 (**Article 1 et 4**) et de caractériser trois autres espèces PMWaV5, 6 et 7 (**Article 4**). Ces six ampélovirus possèdent des génomes de longueurs variant entre 12 971 et 18 388 pb, présentant une organisation typique du sous-groupe I avec dix à onze ORF pour les PMWaV2, 6 et 7, et du sous-groupe II avec sept ORF pour les PMWaV1, 3 et 5. Pour les protéines RdRp, HSP70h et CP, les similarités varient entre 85,7 et 99,2% avec les protéines homologues codants pour les isolats de PMWaV déjà décrits. Quant au PMWaV7, la RdRp et la HSP70h partagent entre 43,0 à 41,2% de similarité en aa avec celles du blackberry vein banding-associated virus, et la CP partage 34,3% de similarité avec celle du grapevine leafroll-associated virus 3.

L'ensemble de nos analyses complète la connaissance des ampélovirus de l'ananas et souligne la diversité d'un genre qui reste probablement encore à être mieux décrit. Par ailleurs, deux autres virus non décrit dans le cadre des articles 3 et 4, ont aussi pu être identifiés (**Tableau 6**) avec un virus du genre *Badnavirus* (contig C-G) et un autre du genre *Sadwavirus* (contigs C-H et C-I).

Tableau 6 : Longueurs, nombre de lectures, couverture et résultats de l'analyse BLASTx sur les contigs co-assemblés avec les *short* et *long reads* sur ananas.

Contigs ID (Length nt)	number of contigs	Contigs length (nt)	Number of reads	Cov ≥ 10 (%)	Cov ≥ 100 (%)	Mean depth	Best hit	Accession nucleotide numbers	Length reference (an en pb)	Identity (%)*	Query cover (%)	ORF / Segment	Virus species
C-G (7,420)	24	80-2,111	20,877	100	99.96	408.97	Pineapple bacilliform comosus virus	OP860303	1,877	96.65	100	RT-RNaseH1	PBCOV
C-H (6,106)	1	6,004	3,067	98.85	2.22	59.63	Pineapple secovirus A	OP860244	6,048	92.21	99	RNA1	PSVA
C-I (4,166)	1	4,133	2,522	97.58	22.95	80.30	Pineapple secovirus A	MN809924	4,161	88.23	99	RNA2	PSVA

4.2 – Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV)

L'assemblage réalisé a permis d'aboutir à une séquence circulaire de 7 420pb (Contig C-G), présentant 96,7% de similarité avec la séquence génomique d'un isolat de *Badnavirus* de l'espèce *Pineapple bacilliform CO virus*, PBCOV (OP860303). Les annotations structurelles et fonctionnelles du génome révèlent une organisation génomique typique du genre *Badnavirus* (famille *Caulimoviridae*), virus à ADN double brin circulaire (Hohn and Rothnie, 2013) (**Figure 49**). En position 5' du génome linéarisé, on retrouve le *putative plant*

initiator tRNA^{MET}-binding site (TGGTATCAGAGC), suivi par trois ORF. Le plus grand, l'ORF3, est une polyprotéine qui code pour des protéines structurales et non structurales, portant les domaines conservés d'une rétropepsine (*pepsine-like aspartic protease*, AP), de la transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT) et de la RNaseH1 (*Ribonuclease H*, RH1).

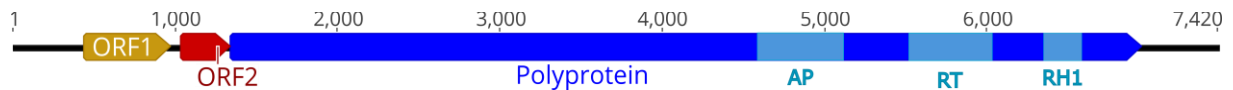


Figure 49 : Représentation schématique linéarisée de l'organisation du génome du PBCOV sur ananas. Les trois ORF sont représentés par des boîtes de différentes couleurs. Les domaines conservés de l'ORF3 sont en bleu clair : protéase (*pepsine-like aspartic protease*, AP), transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT), RNaseH1 (*Ribonuclease H*, RH1).

Des alignements de séquences nucléotidiques de la région RT-RNaseH1 avec les régions homologues des génomes de références des *Badnavirus* ont été réalisés. Les analyses phylogénétiques placent clairement le contig C-G comme proche du PBCOV (**Figure 50 A**). Sur ces deux gènes, il présente 83,7% d'identités nucléiques avec un autre PBCOV (GU121676), le plaçant au-dessus du seuil de démarcation de l'ICTV qui est de 80%.

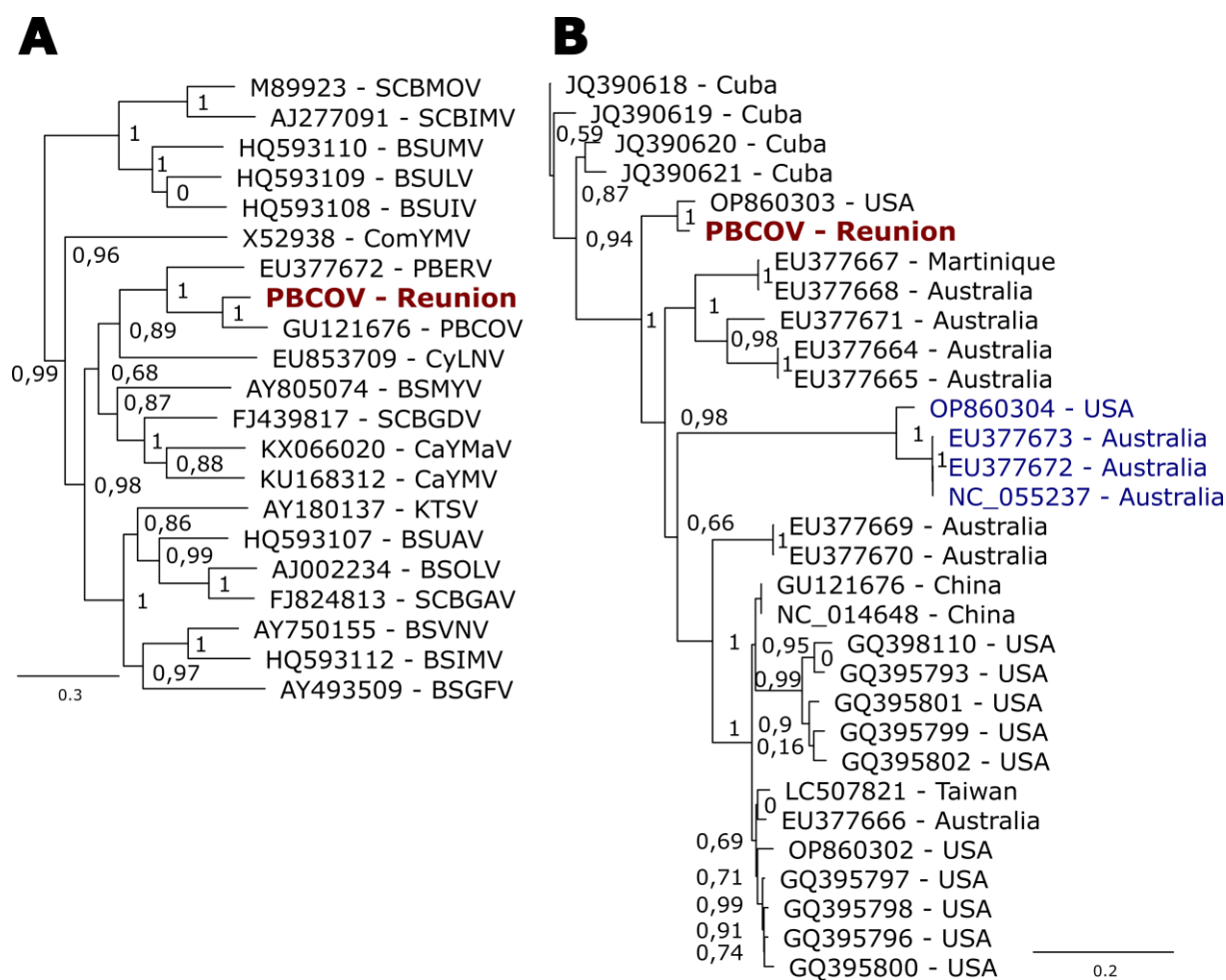


Figure 50 : Arbres phylogénétiques de *Maximum-likelihood* basés sur l'alignement de séquences nucléotidiques correspondant aux domaines RT-RNaseH1, montrant (A) le placement du PBCOV, au sein du genre *Badnavirus*, et (B) l'isolat de La Réunion au sein des séquences de PBCOV disponibles dans GenBank. L'isolat réunionnais est représenté en rouge gras, les accessions de référence en noir et les séquences du PBERV en bleu. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Le PBCOV originellement décrit en Australie par Wakman et al. (1995), a par la suite été caractérisé dans d'autres régions du monde, comme à Hawaï (Sether and Hu, 2002), en Australie (Gambley et al., 2008a), à Cuba (Hernandez-Rodriguez et al., 2013), et plus récemment au Brésil (Santos et al., 2020). L'analyse phylogénétique des 32 isolats de PBCOV référencés sur NCBI montre que l'isolat réunionnais est proche d'un isolat provenant d'Hawaï (96,7% d'identité nucléotidique, domaine RT-RNaseH1). Cependant, nous n'observons aucune structuration géographique en fonction du pays d'origines (**Figure 50 B**).

Le rôle de ce virus dans la MWD reste encore incertain. Plusieurs travaux suggèrent que ce virus ne fait pas partie des causes premières (Gambley et al., 2008a; Sether

and Hu, 2002), mais des relations synergiques avec d'autres virus pourraient être envisagées (Gambley *et al.*, 2008a).

4.3 – Pineapple secovirus A (PSVA)

La recherche de similarité contre une base de référence virale montre que les séquences nucléotidiques des contigs C-H (6 106pb) et C-I (4 166pb) sont apparentées à celles de virus du genre *Sadwavirus*. En effet, elles présentent respectivement 92,2 et 88,2% de similarité avec le segment RNA1 (OP860244) et RNA2 (MN809924) du **pineapple secovirus A (PSVA)**. Les annotations structurelles et fonctionnelles des deux génomes révèlent une organisation génomique typique du genre *Sadwavirus* (famille *Secoviridae*), comprenant deux segments à ARN simple brin polyadénylés (Thompson *et al.*, 2017) (**Figure 51**). Le segment RNA1 code pour une polyprotéine, contenant cinq domaines : Pro-C (*protease factor*), Hel (*helicase*), VPg, (*viral-linked protein*), pro (*protease*) et RdRp, qui sont clivés par des protéases. Le segment RNA2 code pour deux protéines MP et CP.

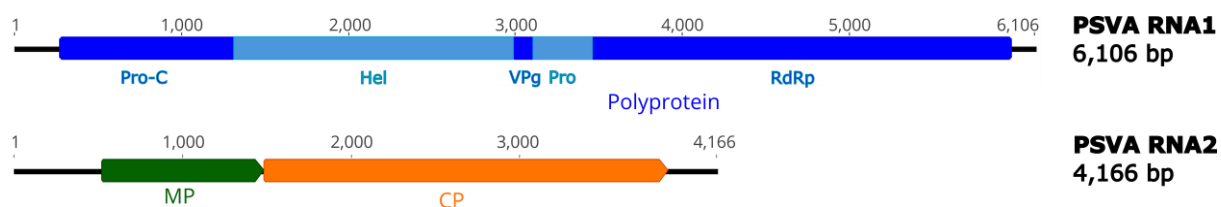


Figure 51 : Organisation du génome du *Sadwavirus* infectant l'ananas : pineapple secovirus A (PSVA), composé du brin RNA1 avec Pro-C, *protease factor* ; Hel, *helicase* ; VPg, *viral-linked protein* ; Pro, *protease* ; RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase* ; et du brin RNA2 avec MP, *movement protein* ; CP, *coat protein*. Les boîtes bleues sur le RNA1 représentent les sites putatifs de clivage des différents domaines.

L'alignement de la séquence en acide aminée de la région Pro-Pol (*protease* et *RdRp*) de l'isolat réunionnais avec des séquences de références des *Sadwavirus* a été réalisé. Les analyses phylogénétiques placent l'isolat réunionnais du PSVA dans le groupe comprenant les autres membres du genre *Sadwavirus* (**Figure 52 A**). La séquence réunionnaise présente 97,1% d'homologie en acide aminé avec la région Pro-Pol d'une séquence de PSVA de Hawaï (MN809923), le plaçant au-dessus du seuil de démarcation de l'ICTV qui est de 80% d'homologie. Il partage seulement 36,0% de similarité avec le PSVB (OM777135). Cette nouvelle

description virale à La Réunion a été confirmé par RT-PCR avec des amorces spécifiques (**Annexe 1**).

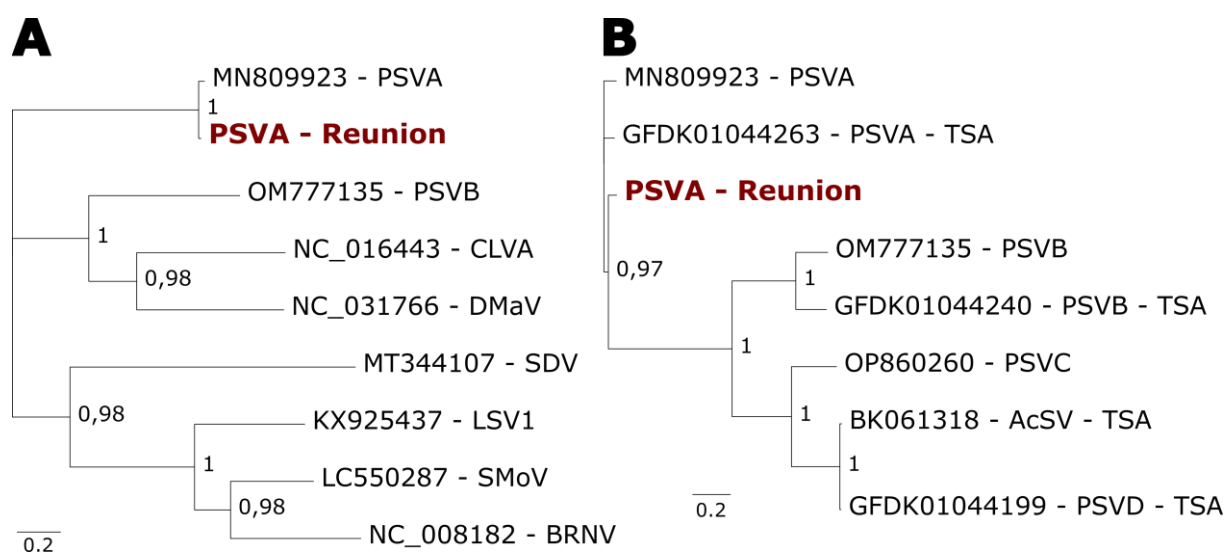


Figure 52 : Arbres phylogénétiques de Maximum-likelihood basés sur l'alignement des séquences d'acides aminés correspondant aux domaines Pro-Pol, montrant le placement de l'isolat réunionnais du PSVA (A) au sein du genre *Sadwavirus*, et (B) au sein de l'ensemble des séquences de *Sadwavirus* isolés à partir d'échantillons d'ananas disponibles sur GenBank (PSVA, PSVB, PSVC, PSVD et le AcSV). L'isolat réunionnais est représenté en rouge. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Récemment, plusieurs isolats des espèces PSVA, B et C ont été décrits à Hawaï (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022a; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b). Une nouvelle espèce potentielle, provisoirement nommée PSVD, a été détecté dans les données publiques *Transcriptome Shotgun assembly* (TSA) disponibles sur NCBI et issues d'un projet de transcriptomique d'ananas collectés en Chine (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022b). Enfin, Kavi Sidharthan *et al.* (2022) en analysant également les bases de données publiques TSA et *Sequence Read Archive* (SRA, NCBI) ont détecté la présence d'une nouvelle espèce de *Secovirus* sur ananas qu'ils ont appelé *Ananas comosus secovirus* (AcSV). Ces données sont issues d'un échantillon d'ananas du cultivar 'yellow mauritius' (appartenant au groupe des 'Queen') qui proviendrait également de Chine. La région Pro-Pol de l'AcSV présente 94,7% d'homologie en acides aminés avec celui du PSVD (**Figure 52 B**). L'existence de cette diversité d'espèces de *Sadwavirus* sur ananas, ouvrent un champ d'étude privilégié pour la suite des travaux sur le virome et sur le rôle potentiel de ce virus dans la MWD.

5 – Analyses comparative de cinq techniques de séquençage à haut débit

Alors qu'un effort plus particulier a été réalisé pour l'application des deux approches rRNA et *long reads* (**point 4 : Caractérisation moléculaire et étude phylogénétique des virus de l'ananas à La Réunion**), l'échantillon 16-1 a aussi été traité selon quatre autres approches reconnues pour l'analyse du virome de plante et ce en collaboration avec des équipes spécialistes de ces approches : **1)** VANA (*Virion-associated nucleic acids*), **2)** dsRNA (*Double-stranded RNA*), **3)** rRNA (*ribosomal RNA depleted total RNA*), et **4)** siRNA (*Virus-derived small interfering RNA*). Ayant connaissance du virome associé à notre échantillon (**point 4**), chacune de ces approches a pu être évaluée pour la capacité à détecter les virus (à ADN ou ARN, avec et sans queue poly(A)), sur différents critères : **(i)** le nombre de *reads* s'alignant sur les différents génomes de virus, **(ii)** la proportion de *reads* viraux (rapportée au million de *reads*), et **(iii)** la couverture de chacun des génomes de virus.

Tout d'abord, une grande variation du nombre de *reads* obtenus pour chacune des approches est observée. Cette variation est liée aux différents niveaux de multiplexage réalisés (pour chacune des approches, notre échantillon a été traité parmi un nombre variable d'autres échantillons), et aux différents efforts de séquençage réalisés (*e.g.* une très grande quantité de *reads* a été obtenue pour l'approche rRNA afin de servir de standard pour nos analyses). Ainsi, le nombre de *reads* obtenus varie de 0,9M (pour l'approche dsRNA) à plus de 100M (pour l'approche rRNA ; **Tableau 4**). Si, comme souligné précédemment la question du seuil du nombre de *reads* minimum à considérer pour valider la présence d'un virus dans un échantillon reste difficile, ici, sans considérer de seuil (*i.e.* un seul *read* considéré comme suffisant pour la détection d'un virus), nous observons une disparité dans la détection de chacun des virus avec entre trois et neuf virus de détectés suivant la méthode. Étant donné que l'effort de séquençage a une influence directe et linéaire sur le nombre de *reads* viraux obtenus, nous avons rapporté ces nombres au million de *reads* séquencés (**Tableau 7**) afin d'opérer à une comparaison plus équitable.

Tableau 7 – Nombre de *reads* viraux par million de *reads* séquencés, pour chaque virus, et chaque approche HTS.

		rRNA _d	dsRNA	siRNA	VANA	long reads	
Total number of reads		137 M	0.89 M	9.06 M	2.00 M	4.90 M	
Type virus							
RNA (+)	Non poly(A)	PMWaV-1	302	100 790	3 184	0	220
		PMWaV-2	1 447	189 913	27 352	97	481
		PMWaV-3	209	15 077	2 018	0	44
		PMWaV-5	142	12 534	194	0	3
		PMWaV-6	53	7	6 727	3	14
		PMWaV-7	167	5 872	2 714	56	67
		PinVA	604	19 267	4 067	0	1 545
	Poly(A)	PSVA-RNA1	22	0	2	0	2
		PSVA-RNA2	18	0	5	0	2
DNA	PBCOV	152	5	5 217	0	215	

Lorsque l'on considère les proportions, ce sont deux méthodes basées sur l'enrichissement de la fraction virale (dsRNA et siRNA) qui montrent les meilleurs résultats, avec 38,8 et 0,6% des séquences obtenues pouvant être attribuées à l'un ou l'autre des neuf virus infectant notre échantillon. De manière plus surprenante, l'approche VANA, elle aussi reposant sur un enrichissement de la fraction virale ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants (0,008% de séquences virales). Au vue des performances décrites dans la littérature pour l'approche VANA (Moubset *et al.*, 2022), cette faible proportion suggère un problème lors de sa mise en œuvre, potentiellement liée à la nature de l'échantillon (l'ananas n'ayant jamais été testé auparavant en VANA) ou à son mode de conservation (la lyophilisation). En conséquence, les résultats de la VANA ont été omis de la comparaison. Les deux approches utilisées initialement pour la caractérisation du virome de l'échantillon (*i.e.* rRNA_d et *long reads*) montrent quant à elle des performances moins bonnes que les méthodes basées sur l'enrichissement. Ce sont 0,002 et 0,05% de *reads* viraux (rapporté au million de *reads*), qui sont obtenus pour l'approche rRNA_d et pour l'approche *long reads* respectivement, soit des proportions de l'ordre de grandeur de 10 à 10 000 fois inférieures aux méthode basées sur l'enrichissement.

Si on s'intéresse à chacun des virus du cortège viral, globalement, c'est le PMWaV2 qui présente le plus grand nombre de lecture pour toutes les approches, hormis l'approche *long reads* (**Tableau 7**). Pour cette dernière, c'est le PinVA, un virus présentant une queue poly(A) et donc parfaitement adapté à ce protocole qui présente le plus de *reads*. Seul l'approche rRNA-d a permis une détection satisfaisante du *secovirus*, autres virus à queue poly(A). A l'inverse, ce virus est proportionnellement peu (siRNA et *long reads*), ou pas détecté (dsRNA) par les autres approches. Enfin, le PBCOV est détecté avec une proportion importante de *reads* pour toutes les méthodes, à l'exception de la méthode dsRNA. Si cette plus mauvaise détection pouvait être attendue dans la mesure où ce virus est le seul virus à ADN du cortège, la non détection du PMWaV6 et du *secovirus* par cette méthode pose question, et soulève l'hypothèse d'une hétérogénéité des charges virales au sein des échantillons traités par chaque partenaire. Pour explorer cette hypothèse, des tests RT-PCR ont été réalisés sur des sauvegardes de préparation réalisées pour le séquençage de dsRNA afin de valider la présence du PSVA et du PMWaV6 dans l'échantillon de départ. Ces tests n'ont pas permis la détection de ces virus confirmant ainsi leur probable absence de l'échantillon et supportant ainsi l'hypothèse du manque d'homogénéité des fractions d'échantillon distribuées à chacun des laboratoires.

Malgré ces limitations, afin de mieux comprendre les spécificités de chacune des méthodes, nous nous sommes intéressés à la relation qui existe entre l'effort de séquençage (*i.e.* quantité de séquences brutes obtenues par échantillon), et les couvertures des génomes. Pour se faire, nous avons calculé la proportion du génome couvert à une profondeur de 10X (*i.e.* le nombre de position du génome d'un virus couvert par au moins dix lectures rapporté à la taille du génome en question) pour différents sous échantillonnages des séquences totales obtenues (**Figure 53**). Nous avons ainsi obtenu la distribution de la couverture attendue du génome (axe des y sur les **Figures 53**) pour chaque virus en considérant différents niveaux d'effort de séquençage (axe des x sur les **Figures 53**).

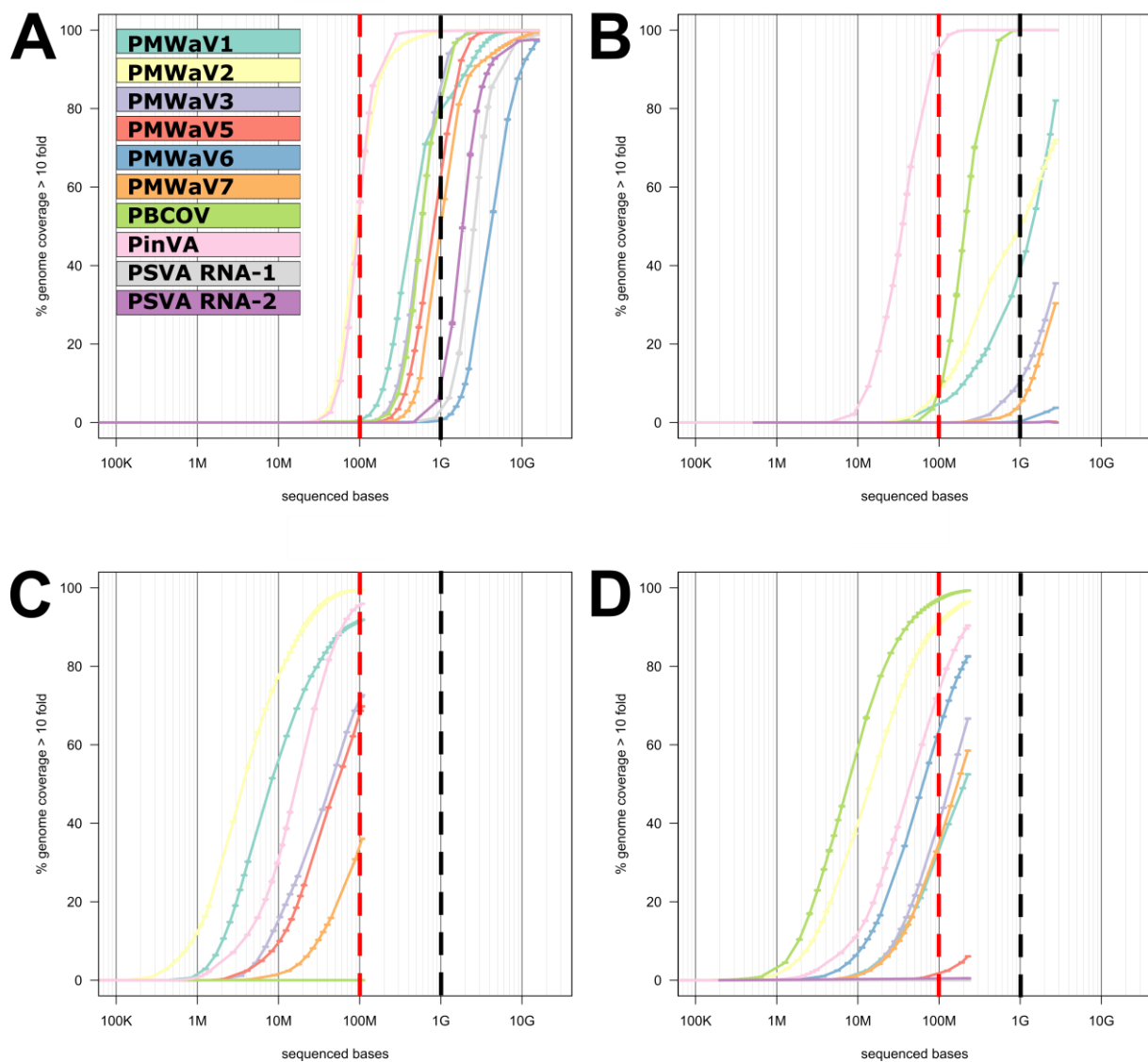


Figure 53 – Pourcentage de couverture des génomes viraux supérieur à dix reads, en fonction du nombre de bases séquencées pour l’approche A) rRNA, B) long reads, C) dsRNA, et D) siRNA. Les lignes en pointillées rouge et noire sont placées à 100Mb et 1Gb séquencées respectivement.

Ce graphique informe sur la couverture des génomes en point final, c’est à dire pour le nombre total de base lue par chacune des méthodes. On observe alors des variations, avec certaines méthodes pour lesquelles les génomes sont entièrement (ou presque) couverts à 10X (e.g. approche rRNA) (**Tableau 53 A**) et d’autres pour lesquelles les couvertures sont plus variables (e.g. approche long reads) (**Tableau 53 B**). Surtout, à l’aide de ces courbes, il est aussi possible de comparer les niveaux de couverture de chaque virus à un niveau d’effort de séquençage donné. En se plaçant à 100Mb, on observe alors de manière conforme aux résultats de l’analyse de la proportion de virus, que ce sont les deux méthodes basées sur

l'enrichissement qui permettent d'obtenir la meilleure couverture des génomes des virus (**Tableau 53 C et D**). Ce niveau d'effort de séquençage est alors suffisant pour obtenir une couverture (toujours à 10X de profondeur) quasi complète des PMWaV1, PMWaV2 et PinVA pour l'approche dsRNA (**Tableau 53 C**), et PMWaV2 et PBCOV pour l'approche siRNA (**Tableau 53 D**). Il est important de noter que les autres virus ont alors des couvertures relativement élevées (58 et 57% de moyenne pour l'approche dsRNA et l'approche siRNA respectivement sans compter les virus non détectés). Alors que pour l'approche *long reads* (**Tableau 53 B**), seul le PinVA est très bien couvert à 100Mb, et pour l'approche rRNA (**Tableau 53 A**) uniquement les génomes du PMWaV2 et PinVA sont partiellement couverts (environ 60%). Les autres virus ne sont alors que peu ou pas couverts. De la même manière, l'analyse à 1Gb ou l'extrapolation des courbes jusqu'au Gb, laisse suggérer que les génomes viraux seront totalement ou très bien couverts pour les méthodes d'enrichissement, alors qu'ils ne le sont que partiellement pour les autres approches.

Enfin, il est intéressant de noter que les pentes représentent la vitesse à laquelle de nouvelles bases sont couvertes lorsque l'on augmente le nombre de *reads*. Alors que celles-ci sont très similaires d'un virus à l'autre pour les approches rRNA et siRNA (**Tableau 53 A et D**), elles sont plus variables pour les autres méthodes. En particulier, pour l'approche *long reads* (**Tableau 53 B**) les variations importantes indiquent que le séquençage du génome de certains virus a été privilégié par rapport à d'autres. L'analyse de l'alignement des *reads* sur les génomes de référence montrent d'ailleurs que ce sont les zones riches en poly(A) qui ont permis l'obtention de cDNA (résultats non présentés). Celles-ci n'étant pas réparties de manière régulière entre, et au sein de chacun des génomes viraux, des régions et des virus sont alors mieux séquencés que d'autres. Cela indique que les développements méthodologiques devront être poursuivis afin de permettre un séquençage plus homogènes en *long reads*.

Si l'ensemble de ces résultats démontrent l'intérêt de l'enrichissement, la grande facilité de mise en œuvre des approches 'directes' contrebalancent leurs moindres performances. C'est alors une analyse coût/résultat qu'il faut opérer pour bien décider de l'approche à privilégier pour un laboratoire. Il peut effectivement être plus facile et moins onéreux d'obtenir un très grand nombre de *reads* pour une

approche comparée à une autre. Enfin, la combinaison de plusieurs approches pourrait offrir une solution pour pallier au limitation de chacune d'entre elle.

6 – Conclusion

Nos résultats mettent en évidence une **diversité virale** importante chez l'**ananas** à La **Réunion** avec la **caractérisation de neuf génomes** complets ou quasi complets : des virus déjà connus (PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 et PBCOV), la première séquence complète du PMWaV5, des virus uniquement décrits à ce jour à Hawaï (PMWaV6 et PSVA) et des nouveaux virus (PMWaV7 et PinVA) (**Articles 3 et 4**). Ces résultats ont pu être obtenus grâce à l'optimisation d'un protocole d'extraction de l'ARN total chez l'ananas, à la fois pour le séquençage *short* et *long reads*. Face à la difficulté de comparer précisément les cinq approches HTS (VANA, dsRNA, rRNAd, siRNA, *long reads*) les plus couramment utilisées pour le diagnostic métagénomique des virus de plantes, nous avons porté nos efforts sur la comparaison des approches *short reads* (**rRNAd, Illumina**) et *long reads* (**Nanopore, MinION**) (**Article 4**), qui nous ont permis de caractériser l'ensemble des virus. Cependant, bien que les résultats suggèrent que l'enrichissement est plus performant, ces approches se distinguent par leur simplicité. Aussi le choix de l'approche ou de la combinaison d'approches, doit être basé sur une analyse coût/bénéfice dépendante de l'objectif de recherche de chaque laboratoire.

Article 3

Identification of a novel vitivirus from pineapple in Reunion Island



Identification of a novel vitivirus from pineapple in Reunion Island

Delphine Massé^{1,2} · Denis Filloux^{3,4} · Thierry Candresse⁵ · Sébastien Massart⁶ · Armelle Marais⁵ · Eric Verdin⁷ · Nathalie Cassam¹ · Emmanuel Fernandez^{3,4} · Philippe Roumagnac^{3,4} · Pierre-Yves Teycheney⁸ · Pierre Lefevre⁸ · Jean-Michel Lett⁸

Received: 15 February 2022 / Accepted: 11 May 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2022

Abstract

We report the complete genome sequence of a novel member of the genus *Vitivirus* (family *Betaflexiviridae*, subfamily *Trivirinae*) infecting pineapple. The complete genome sequence of this virus was obtained from total RNA extracted from pineapple leaf samples collected in Reunion Island, using a combination of high-throughput sequencing technologies. The viral genome is 6,757 nt long, excluding the poly(A) tail, and shares all the hallmarks of vitiviruses. Phylogenetic analysis performed on the replication-associated protein and capsid protein gene sequences unambiguously place this new virus, for which we propose the name “pineapple virus A”, in the genus *Vitivirus*.

The genus *Vitivirus* (family *Betaflexiviridae*, subfamily *Trivirinae*) comprises viruses with filamentous particles 725–825 nm in length and 12 nm in diameter [1]. Each virion contains one copy of a 7- to 7.6-kb positive-sense RNA genome with five open reading frames (ORFs) encoding a replication-associated protein (RAP, ORF1) with an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain required for replication, a protein of unknown function (ORF2), a

putative movement protein (MP, ORF3), a coat protein (CP, ORF4), and a putative nucleic acid binding protein (NABP, ORF5), respectively. The genus *Vitivirus* was initially created to accommodate grapevine viruses sharing similar genome features and organizations. It now also includes viruses infecting other hosts and currently has 17 species, whose members have mostly been identified in woody or perennial hosts [2]. Additional viruses that putatively belong to new species in the genus have also been reported but have yet to be recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [2].

A leaf sample from a pineapple plant showing reddening and leaf tip dieback typical of pineapple mealybug wilt disease was collected in March 2016 in Saint Pierre (Reunion Island) and used to extract total RNA using an RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France). Illumina RNA sequencing was performed by Genewiz (Leipzig, Germany) after ribodepletion. A total of ~63M 2 x 150-nt paired-end reads were obtained. In parallel, Nanopore sequencing was performed using a MinION portable device and a cDNA-PCR Barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK), and this generated ~1.1M reads with a mean quality of 9.8 (corresponding to an expected error rate of 10.47%) and with sizes ranging from 88 to 5,893 nt. Co-assembly of the reads generated by both techniques was then performed using SPAdes v3.13 [3]. Assembled contigs were used for BLASTn and BLASTx searches against a virus database derived from GenBank. A contig of ~7 kb showed similarity to vitivirus sequences. Other contigs with similarities to

Handling Editor: Sead Sabanadzovic.

✉ Jean-Michel Lett
lett@cirad.fr

¹ ANSES, LSV RAPT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

² Université de La Réunion, UMR PVBMT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

³ UMR PHIM, CIRAD, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex-5, France

⁴ PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, 34090 Montpellier, France

⁵ Univ. Bordeaux, INRAE, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

⁶ Plant Pathology Laboratory, TERRA, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 5030 Gembloux, Belgique

⁷ INRAE, UR407 Unité de Pathologie Végétale, CS 60094, 84140 Montfavet, France

⁸ CIRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

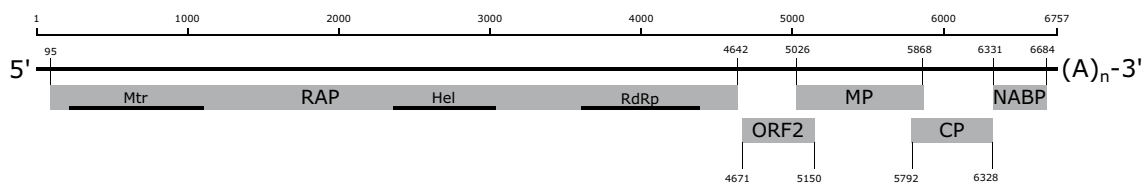


Fig. 1 Schematic representation of the genome organization of pineapple virus A. ORFs are represented as grey boxes. Mtr, methyl transferase domain; Hel, helicase domain; RdRp, RNA-dependent RNA

polymerase domain; RAP, replication-associated protein; MP, movement protein; CP, coat protein; NABP, nucleic acid binding protein

ampeloviruses (genus *Ampelovirus*, family *Closteroviridae*) associated with pineapple mealybug wilt disease (PMWD) and described previously in Reunion Island [4] were also obtained.

The sequences of the 5' and 3' ends of the putative vitivirus genome were obtained from the MinION reads by searching for the strand-switching primer (SSP) incorporated during the MinION reaction and the poly(A) tail, respectively. All Illumina reads were mapped back onto the complete assembled viral genome sequence (mean position coverage of ~1,200), and the sequence was polished using Pilon V1.23 [5], resulting in a 6,757-nt genome sequence (excluding the poly(A) tail). The typical five ORFs of vitiviruses were predicted using DNAMAN software V5.2.2 (Lynnon Biosoft, San Ramon, USA). From 5' to 3', they encode a putative 1,515-aa replication-associated protein (RAP) with a methyltransferase domain located near the N-terminus, a helicase domain in its core, and an RdRp domain near the C-terminus, a 280-aa protein of unknown function, a 178-aa putative movement protein, a 159-aa coat protein, and a 117-aa nucleic acid binding protein most closely related to those of vitiviruses in the grapevine virus E (GVE) clade [2] (Fig. 1). The slightly shorter size of this genome compared to those of other vitiviruses could be attributed to the lack of the alkylation B (AlkB) domain usually present in ORF1 of vitiviruses. This domain is similarly absent in the genome of another vitivirus, *Agave tequilina* leaf virus (ALTV) [2].

Phylogenetic analysis of the RAP and CP sequences of the newly identified virus was performed on sequence alignments obtained using MAFFT [6]. Reference sequences of all members of the subfamily *Trivirinae* and those of yet unclassified putative vitiviruses were included in the analysis (Supplementary Table S1). The RAP and CP both

sequences shared less than 72% nucleotide (nt) or 80% amino acid (aa) sequence identity with their counterparts from other members of the genus *Vitivirus* (Supplementary Table S2), which are the molecular demarcation criteria for new species in the family *Betaflexiviridae* [7]. Hence, the assembled genome sequence belongs to a virus for which the name "pineapple virus A" (PinVA) is proposed. PinVA RAP shares the highest similarity with mint virus 2 (59.1% nt and 36.3% aa sequence identity), whereas PinVA CP shares the highest similarity with blueberry green mosaic associated virus (55.3% nt sequence identity) and grapevine virus G (44.6% aa sequence). Maximum-likelihood phylogenetic trees corresponding to the aa sequences of RAP (Fig. 2A) and CP (Fig. 2B) were constructed using Fasttree V2.1.11 [8], with the LG substitution model with gamma-distributed rate among sites and the Shimodaira–Hasegawa-like test (SH-like) for branch support (1,000 replicates). The RAP and CP trees both show that PinVA is clearly a member of genus *Vitivirus*, branching at a basal position. However, phylogenetic analysis could not resolve whether PinVA is a closer relative to members of either the GVA or GVE clade defined by Maree *et al.* [2], even when complete genome sequences were used (data not shown). Our findings extend the known diversity and host range of vitiviruses. Additional work is now required to assess the role of PinVA, if any, in the etiology of PMWD. Interestingly, a previous study has suggested that grapevine-associated vitiviruses may not elicit discernible disease symptoms but may increase the severity of some grapevine diseases [9]. Understanding how PinVA interacts with pineapple mealybug wilt-associated ampeloviruses [10] may help unravel the etiology of pineapple mealybug-wilt disease.

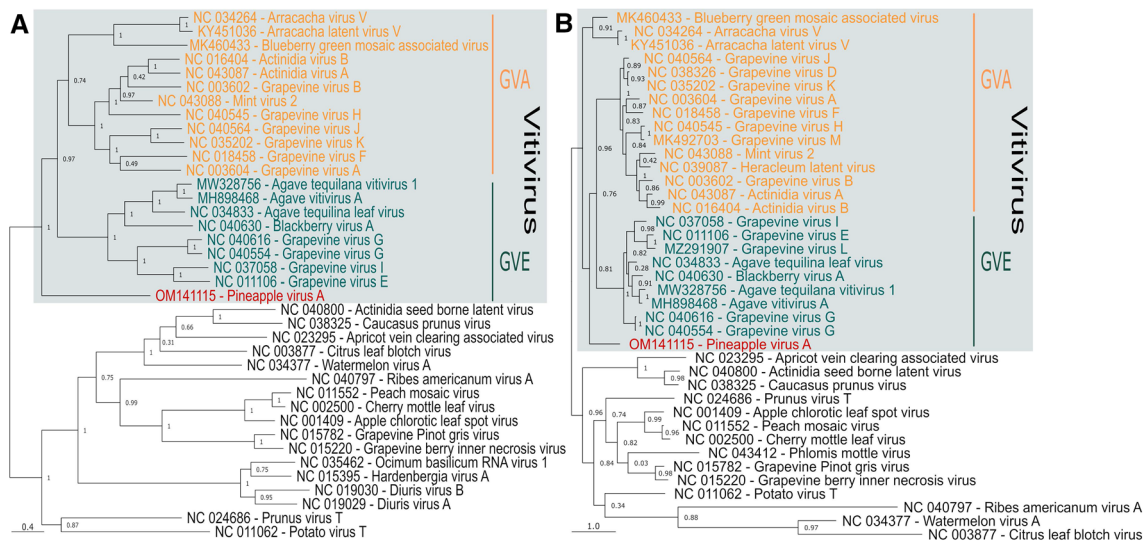


Fig. 2 Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees showing the placement of pineapple virus A (PinVA) among *Trivirinae* reference sequences and yet unclassified putative vitiviruses, based on the alignment of conceptually translated sequences of the replication-associated protein (A) and the capsid protein (B). The reference

sequences of vitiviruses are shaded in grey, with the GVA clade indicated in orange, the GVE clade in green, and PinVA in red. Values associated with nodes indicate SH-like local support for the branches. The scale bar shows the number of substitutions per site. GenBank accession numbers are shown.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05512-9>.

Funding This study was funded by the European Union (ERDF, INTERREGV), the Conseil Régional de La Réunion, Anses, and CIRAD.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Adams MJ, Candresse T, Hammond J, Kreuze JF, Martelli GP, Namba S, Pearson MN, Ryu KH, Saldarelli P, Yoshikawa N (2012) Family *Betaflexiviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) Virus taxonomy, vol 152. 9th report of the ICTV, vol 152. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp 920–941. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00078-1>
2. Maree HJ, Blouin AG, Diaz-Lara A, Mostert I, Al Rwhanih M, Candresse T (2020) Status of the current vitivirus taxonomy. Arch Virol 165:451–458. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04500-w>
3. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD et al (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

4. Massé D, Cassam N, Hostachy B, Iskra Caruana M-L, Darnaudery M, Lefeuvre P, Lett J-M (2021) First report of three pineapple mealybug wilt-associated viruses in Queen Victoria Pineapples in Reunion Island. Plant Dis 105:715–715. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-20-1068-pdn>
5. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK (2014) Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. PLoS ONE 9:e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
6. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
7. Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M et al (2004) Virology Division News: the new plant virus family flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. Arch Virol 149:1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
8. Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE 5:e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
9. Meng B, Martelli GP, Golino DA, Fuchs M (2017) Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management, Ch11, 1st edn. Springer, Cham, pp 229–257. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
10. Dey KK, Green JC, Melzer M, Borth W, Hu JS (2018) Mealybug wilt of pineapple and associated viruses. Horticulturae 4:52. <https://doi.org/10.3390/horticulturae4040052>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Figures et tableaux supplémentaires

Supplementary Table 1. List of sequences used in pairwise identity comparisons and phylogenetic analysis

Accession number	Virus name (Acronym)	Species name	Genus
NC_043087	Actinidia virus A (AcVA)	<i>Actinidia virus A</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_016404	Actinidia virus B (AcVB)	<i>Actinidia virus B</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_034833	Agave tequilana leaf virus (ATLV)	Agave tequilana leaf virus	<i>Vitivirus</i>
MW328756	Agave tequilana vitivirus 1 (ATLV1)	Agave tequilana vitivirus 1	<i>Vitivirus</i>
MH898468	Agave vitivirus A (AVA)	Agave vitivirus A	<i>Vitivirus</i>
KY451036	Arracacha latent virus V (ALVV)	Arracacha latent virus V	<i>Vitivirus</i>
NC_034264	Arracacha virus V (AVV)	<i>Arracacha virus V</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_040630	Blackberry virus A (BVA)	<i>Blackberry virus A</i>	<i>Vitivirus</i>
MK460433	Blueberry green mosaic associated virus (BGMaV)	Blueberry green mosaic associated virus	<i>Vitivirus</i>
NC_003604	Grapevine virus A (GVA)	<i>Grapevine virus A</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_003602	Grapevine virus B (GVB)	<i>Grapevine virus B</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_038326	Grapevine virus D (GVD)	<i>Grapevine virus D</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_011106	Grapevine virus E (GVE)	<i>Grapevine virus E</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_018458	Grapevine virus F (GVF)	<i>Grapevine virus F</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_040554	Grapevine virus G (GVG)	<i>Grapevine virus G</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_040616	Grapevine virus G (GVG)	<i>Grapevine virus G</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_040545	Grapevine virus H (GVH)	<i>Grapevine virus H</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_037058	Grapevine virus I (GVI)	<i>Grapevine virus I</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_040564	Grapevine virus J (GVJ)	<i>Grapevine virus J</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_035202	Grapevine virus K (GVK)	Grapevine virus K	<i>Vitivirus</i>
MZ291907	Grapevine virus L (GVL)	Grapevine virus L	<i>Vitivirus</i>
MK492703	Grapevine virus M (GVH)	Grapevine virus M	<i>Vitivirus</i>
NC_039087	Heracleum latent virus (HLV)	<i>Heracleum latent virus</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_043088	Mint virus 2 (MV2)	<i>Mint virus 2</i>	<i>Vitivirus</i>
NC_003877	Citrus leaf blotch virus (CLBV)	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	<i>Citivirus</i>
NC_019029	Diuris virus A (DVA)	<i>Diuris virus A</i>	<i>Divavirus</i>
NC_019030	Diuris virus B (DVB)	<i>Diuris virus B</i>	<i>Divavirus</i>
NC_015395	Hardenbergia virus A (HVA)	<i>Hardenbergia virus A</i>	<i>Divavirus</i>
NC_035462	Ocimum basilicum RNA virus 1 (ObRV1)	Ocimum basilicum RNA virus 1	<i>Divavirus</i>
NC_040800	Actinidia seed borne latent virus (ASbLV)	<i>Actinidia seed borne latent virus</i>	<i>Prunevirus</i>
NC_023295	Apricot vein clearing associated virus (AVCaV)	<i>Apricot vein clearing associated virus</i>	<i>Prunevirus</i>
NC_038325	Caucasus prunus virus (CPV)	<i>Caucasus prunus virus</i>	<i>Prunevirus</i>
NC_040797	Ribes americanum virus A (RAVA)	<i>Ribes americanum virus A</i>	<i>Ravavirus</i>
NC_011062	Potato virus T (PVT)	<i>Potato virus T</i>	<i>Tepovirus</i>
NC_024686	Prunus virus T (PrVT)	<i>Prunus virus T</i>	<i>Tepovirus</i>
NC_001409	Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_002500	Cherry mottle leaf virus (CMLV)	<i>Cherry mottle leaf virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_015220	Grapevine berry inner necrosis virus (GINV)	<i>Grapevine berry inner necrosis virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_015782	Grapevine Pinot gris virus (GPGV)	<i>Grapevine Pinot gris virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_011552	Peach mosaic virus (PcMV)	<i>Peach mosaic virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_043412	Phlomis mottle virus (PhMV)	<i>Phlomis mottle virus</i>	<i>Trichovirus</i>
NC_034377	Watermelon virus A (WVA)	<i>Watermelon virus A</i>	<i>Wamavirus</i>

Supplementary Table 2. Percent nucleotide and amino acid identities with pineapple vitivirus A for related vitiviruses in RAP and CP genes

Virus name	Accession number	RAP		CP	
		nt	aa	nt	aa
Arracacha latent virus V	KY451036	47.6	25.6	51.5	36.9
Agave vitivirus A	MH898468	48.8	28.9	52.2	41.1
Blueberry green mosaic associated virus	MK460433	48.0	27.1	55.3	42.1
Grapevine virus M	MK492703	NA*	NA*	52.5	40.0
Agave tequilana vitivirus 1	MW328756	48.8	29.7	51.7	38.4
Grapevine virus L	MZ291907	NA*	NA*	48.9	35.7
Apple chlorotic leaf spot virus	NC_001409	42.1	22.3	43.0	23.1
Cherry mottle leaf virus	NC_002500	41.4	20.4	41.7	24.0
Grapevine virus B	NC_003602	48.9	28.8	48.9	30.9
Grapevine virus A	NC_003604	49.9	27.9	51.5	38.2
Citrus leaf blotch virus	NC_003877	43.2	21.5	39.3	21.6
Potato virus T	NC_011062	43.3	20.6	40.5	22.7
Grapevine virus E	NC_011106	47.6	23.5	49.2	39.2
Peach mosaic virus	NC_011552	42.1	21.4	41.5	23.1
Grapevine berry inner necrosis virus	NC_015220	40.8	20.0	45.2	26.4
Hardenbergia virus A	NC_015395	41.6	20.6	NA*	NA*
Grapevine Pinot gris virus	NC_015782	41.3	20.0	43.1	25.5
Actinidia virus B	NC_016404	49.7	28.4	52.1	34.5
Grapevine virus F	NC_018458	49.5	27.0	50.2	36.4
Diuris virus A	NC_019029	42.4	19.8	NA*	NA*
Diuris virus B	NC_019030	42.3	20.6	NA*	NA*
Apricot vein clearing associated virus	NC_023295	42.7	21.5	40.2	18.6
Prunus virus T	NC_024686	45.1	22.9	38.0	19.3
Arracacha virus V	NC_034264	48.0	26.6	51.5	37.8
Watermelon virus A	NC_034377	42.2	20.3	36.3	11.3
Agave tequilana leaf virus	NC_034833	48.3	28.2	52.6	41.1
Grapevine virus K	NC_035202	48.1	27.2	52.8	40.9
Ocimum basilicum RNA virus 1	NC_035462	40.8	20.1	NA*	NA*
Grapevine virus I	NC_037058	46.7	25.0	47.3	39.3
Caucasus prunus virus	NC_038325	43.5	23.0	37.5	21.8
Grapevine virus D	NC_038326	NA*	NA*	52.8	44.2
Heracleum latent virus	NC_039087	NA*	NA*	49.1	36.4
Grapevine virus H	NC_040545	49.6	28.4	52.8	38.2
Grapevine virus G	NC_040554	46.4	22.9	50.6	44.6
Grapevine virus J	NC_040564	49.1	27.7	53.0	40.0
Grapevine virus G	NC_040616	46.7	25.1	52.4	42.9
Blackberry virus A	NC_040630	48.4	28.4	50.4	38.4
Ribes americanum virus A	NC_040797	42.7	20.1	35.7	17.8
Actinidia seed borne latent virus	NC_040800	42.4	21.3	39.7	20.8
Actinidia virus A	NC_043087	49.0	27.6	53.6	36.4
Mint virus 2	NC_043088	59.1	36.3	52.3	35.5
Phlomis mottle virus	NC_043412	NA*	NA*	39.7	21.5

* Not applicable, as RAP or CP were not predicated for this virus

Article 4

**Characterization of six ampeloviruses infecting pineapple in
Reunion Island using a combination of high-throughput
sequencing approaches**

Characterization of six ampeloviruses infecting pineapple in Reunion Island using a combination of high-throughput sequencing approaches

Delphine Massé^{1,2*}, Thierry Candresse³, Denis Filloux^{4,5}, Sébastien Massart⁶, Nathalie Cassam¹, Bruno Hostachy¹, Armelle Marais³, Emmanuel Fernandez^{4,5}, Philippe Roumagnac^{4,5}, Eric Verdin⁷, Pierre-Yves Teycheney⁸, Jean-Michel Lett⁸, Pierre Lefeuvre⁸

- ¹ ANSES - LSV RAPT, F-97410, Saint Pierre, La Réunion, France; delphine.masse@anses.fr (D.M.); nathalie.cassam@anses.fr (N.C.); bruno.hostachy@anses.fr (B.H.)
- ² Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97410 St Pierre, La Réunion, France;
- ³ Univ. Bordeaux, INRAE, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, CS20032, 33882 Villenave d'Ormon cedex, France; thierry.candresse@inrae.fr (T.C.); armelle.marais-colombel@inrae.fr (A.M.C.)
- ⁴ CIRAD, UMR PHIM, 34090 Montpellier, France; denis.filloux@cirad.fr (D.F.); emmanuel.fernandez@cirad.fr (E.F.); philippe.roumagnac@cirad.fr (P.R.)
- ⁵ PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France
- ⁶ Plant Pathology Laboratory, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 5030, Gembloux, Belgique; sebastien.massart@uliege.be (S.B.)
- ⁷ INRAE, UR407 Unité de Pathologie Végétale, CS 60094, 84140 Montfavet, France; eric.verdin@inrae.fr (E.V.)
- ⁸ CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 St Pierre, La Réunion, France (pierre-yves.teycheney@cirad.fr (P.Y.T.); jean-michel.lett@cirad.fr (J.M.L.); pierre.lefeuvre@cirad.fr (P.L.)

* Correspondence: delphine.masse@anses.fr;

Abstract: The cultivation of pineapple (*Ananas comosus*) is threatened worldwide by the mealybug wilt disease of pineapple (MWP), with a not fully elucidated etiology. In this study, we characterized pineapple mealybug wilt-associated ampeloviruses (PMWaVs) from a diseased pineapple plant collected in Reunion Island, using a high-throughput sequencing approach combining Illumina short and Nanopore long reads. Reads co-assembly resulted in complete or near complete genomes for six distinct ampeloviruses (family *Closteroviridae*), including the first complete genome of pineapple mealybug wilt-associated virus 5 (PMWaV5) and that of a new species tentatively named PMWaV7. Short reads data provided high genome coverage and sequencing depths for all six viral genomes, contrary to long reads data. However, the 5' and 3' ends of the genome for most of the six ampeloviruses could be recovered from long reads, providing an alternative to RACE-PCRs. Phylogenetic analyses did not unveil any geographic structuring of the diversity of PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 isolates, supporting the current hypothesis that PMWaVs were mainly spread by human activity and vegetative propagation.

Keywords: *Ananas comosus*, pineapple mealybug wilt-associated virus, ampelovirus, high-throughput sequencing, short and long reads, molecular diversity.

1. Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* L. [Merr.]) is a tropical plant in the family *Bromeliaceae*. It is grown extensively throughout the tropics and subtropics for its edible fruits. In 2021, worldwide pineapple production was estimated at 28.6 million metric tons, making it the third largest tropical fruit production worldwide [1]. Among the many pests and diseases that hamper the cultivation of pineapple, the mealybug wilt of pineapple (MWP) is the most important and complex disease [2]. Typical symptoms of MWP include reddening and/or yellowing of the leaves, downward curling of margin tips, leaf-tip dieback, wilting and root decay [3-5]. MWP has been reported to cause yield reductions of up to 55% [6,7].

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Since its first description in Hawaii in 1910 [8], MWP has been described in most pineapple growing areas.

The involvement of a virus in the etiology of MWP was first supported by immunological evidence in 1962 [9]. Long, flexuous, rod-shaped virus particles and high molecular weight double stranded RNA were later observed in infected plants [10,11] and the observed virus was assigned to genus *Ampelovirus* [2,12], in the family *Closteroviridae* [13]. Ampeloviruses have single stranded positive-sense RNA genomes ranging in size between 13.0 and 18.5 kb, with 7 to 12 open reading frames (ORFs) [14] and are distributed in two subgroups (I and II) depending on genome organisation and phylogenetic relationships [15,16]. Eleven species and two tentative species are currently assigned to the *Ampelovirus* genus. Among these, three pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs) have been reported on pineapple, belonging to species recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV1), PMWaV2 and PMWaV3 [15]. Additional ampeloviruses described in pineapple include PMWaV4, which was later reassigned as a strain of PMWaV1 [17], PMWaV5 [6,17], for which only a partial genome sequence is available and more recently PMWaV6, for which a complete genome sequence was obtained using a high-throughput sequencing (HTS) [18]. Ampeloviruses are transmitted by mealybugs (*Pseudococcidae*) and scale insects (*Coccidae*), in a semi-persistent mode [14,19]. There is no evidence of seed or mechanical transmission. Long distance dissemination primarily occurs through the exchange of infected propagation materials and germplasm [20].

The etiology of MWP has not been fully elucidated yet. Biotic and abiotic factors, such as environmental factors, the presence of mealybugs and co-infections with distinct ampeloviruses and/or with viruses from other genera may be involved. In Hawaii, only pineapple plants infected by PMWaV2 and infested with mealybugs were reported to display MWP symptoms [21]. However, another study conducted in Australia suggested that the presence of PMWaV1 and PMWaV3 [6], together with other viruses such as badnaviruses, was involved in the etiology of MWP.

Moreover, the regular discovery of new viruses and the frequent occurrence of viral co-infections in pineapple represent a challenge for serological or PCR-based diagnostics. HTS-based approaches, which have enabled the discovery and detection of new viruses and viral strains in a large range of plants [22-24], have been successfully applied to the characterization of several ampeloviruses infecting pineapple [18,25] and have a clear potential for the diagnosis of viruses in pineapple.

The current diversity of pineapple viruses and the still unresolved etiology of MWP argue for a better characterization of the pineapple virome. Hence, we compared and assessed here two different HTS strategies for the characterization of ampelovirus genomes using total RNA extracted from a symptomatic pineapple plant. The first strategy is based on ribodepletion of total RNA, conversion to cDNA and Illumina short read sequencing, while the second is based on cDNA synthesis from poly-A tailed RNA and Nanopore long read sequencing. Using the combination of these methods, we obtained near complete genome sequences of PMWaV2, PMWaV3, PMWaV5, and PMWaV6, and complete genome sequences of PMWaV1 and a putative new ampelovirus tentatively named pineapple mealybug wilt-associated virus 7 (PMWaV7). Phylogenetic analyses of PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 suggest that recurrent exchanges of infected germplasm promoted the worldwide dissemination of these viruses.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

In 2016, one plant of cultivar “Queen Victoria” showing reddening and leaf tip die-back symptoms was collected from Cirad’s experimental station at Bassin Plat in Saint Pierre (Reunion Island, France). Two full leaves from this plant (referred to as sample 16-1) were collected, cut in ~ 0.5 cm² pieces of and stored at -80°C until further use.

2.2. RNA extraction

Total RNA was extracted from the 16-1 leaf sample using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, including the optional DNase treatment (DNase I, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US). RNA quality was assessed from the A260/280 and A260/230 ratios measured using a NanoVue spectrophotometer (Cytiva, Washington, US) and from the RNA Integrity Number (RIN) value obtained using an Agilent TapeStation and the RNA 6000 Pico chip (Agilent Technologies, California, US). Purified RNA was quantified using a Qubit Fluorometer 2.0 (Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US)). Total RNA samples were stored at -80°C until further use.

2.3. High-throughput sequencing

Two HTS approaches were used in the study. In the first approach (hereafter referred to as "short read approach"), two Illumina sequencing runs were performed. The first run was performed according to Marais et al. [26]. Briefly, ribosomal RNAs were removed from total RNAs using a RiboMinus Plant Kit (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France). A cDNA library was generated using the Illumina TruSeq Stranded RNA library prep kit (Illumina, San Diego, CA, US) and sequenced on an Illumina NextSeq500 (2×150bp) (GIGA-Genomics Facility, Université de Liège, Liège, Belgium). For the second run, libraries preparation and sequencing were performed by Genewiz (now Azenta Life Sciences, New Jersey, USA) using the Ribozero plant rRNA depletion kit and the TruSeq stranded total RNA library Prep kit (Illumina, San Diego, CA, US), followed with a paired-ends 2×150bp run on an Illumina NovaSeq sequencer.

In the second approach, hereafter referred to as "long read approach", nanopore sequencing was performed using the MinION device (Mk1B, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). For this, a cDNA library was generated from total RNAs, using the cDNA-PCR Barcoding kit SQK-PCB109 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions except that Sera-Mag Select Size Selection beads (Cytiva, Washington, USA) were used for the nucleic acid purification step of the procedure. Two distinct sequencing runs were performed. In the first one, the RNA sample was treated in quadruplicate using distinct barcodes. A cDNA library with equimolar concentrations of products from each replicate was produced. In the second run, a single cDNA library was prepared from the RNA sample. In both runs, libraries were loaded on FLO-MIN 106D R9.4.1 flowcells and sequencing was performed using a Mk1B MinION device (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) and monitored using the MinKNOW v21.11.8 software (ONT) for 16 and 28 hours, respectively.

2.4. Data analysis and assembly of viral genomes

Sequencing data were uploaded on the Galaxy server of the Migale bioinformatics facility (<https://migale.inrae.fr>) and analysed using a homemade workflow described below. Demultiplexing and quality control of short reads were performed using Trimmomatic v0.38.1 [27]. After adapters and tags removal using default settings, reads were quality trimmed using a minimum quality score of 25 and a minimum read length of 80 nt. For long reads, highly accurate base calling was performed using the Guppy v6.0.1 software (ONT) and reads that passed the default quality threshold (mean read PHRED score of 7) were processed with PoreChop v0.2.4 [28] for adapters removal and demultiplexing when needed. Reads shorter than 80 nt were removed using NanoFilt v0.1.0 [29].

Hybrid *de novo* assembly of short and long reads was then performed using SPAdes v3.13 [30] on the SouthGreen bioinformatic platform [31]. Then, viral contigs were identified using BLASTn and BLASTx searches against the reference viral sequences database retrieved from GenBank in April 2022 (v211). When possible, viral contigs were merged using the EGAssembler [32] before being polished using Pilon v1.23 [33] by mapping back short reads using the BWA-MEM algorithm (BWA v0.7017.1) [34]. Each set of trimmed

and demultiplexed reads were individually mapped against polished viral contig references using BWA-MEM for short reads and Minimap2 v2.17 [35] for long reads, respectively. After discarding non-primary alignments, mapping statistics were obtained using Samtools v1.9 [36]. Subsamplings of the mapped reads were performed in order to estimate the coverage of viral contigs as a function of total reads number. To this end, the actual number of reads mapped per position were evaluated 100 times for sets of decreasing sequencing efforts. Sequencing depth (the number of times a position was covered with a read) and breadth of the coverage (the proportion of the genome that is covered with reads) were computed for each subsample.

2.5. Detection of PMWaVs by RT-PCR

RT-PCR diagnosis was performed in order to confirm the presence of the viruses detected by HTS. Specific primers for the detection of PMWaV1 and PMWaV3 [6] and for the detection of PMWaV2 [2] were used in a multiplex RT-PCR (Supplementary Table 1). Additionally, simplex RT-PCRs were carried out to detect PMWaV5, PMWaV6 and PMWaV7 using virus-specific primers (Supplementary Table 1) designed from available complete viral genome sequences present in GenBank.

Reactions were performed using One-Step RT-PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany) in a Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US). For the multiplex detection of PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3, the reaction mix contained 2.5 µL of 5X RT-PCR Buffer, 0.5 µL of 10 mM dNTPs, 1.25 µL of a primer mix containing PMWaV1 and PMWaV3 specific primers at a concentration of 10 mM, 2 µL of a primer mix containing the PMWaV2 specific primers at a concentration of 10 mM, 2 µL of RT-Taq DNA polymerase mix, 2 µL of total plant RNA extracts and nuclease-free water to a total reaction volume of 25 µL. For the simplex detection of PMWaV5, PMWaV6 or PMWaV7, the reaction mix contained 5 µL of 5X RT-PCR Buffer, 1 µL of 10 mM dNTPs, 1.5 µL of a primer mix containing each specific primer at a concentration of 10 mM, 1 µL of RT-Taq DNA polymerase mix, 2 µL of total plant RNA extracts and nuclease-free water to a total reaction volume of 25 µL. RT-PCR conditions were a reverse-transcription step of 30 min at 50°C followed by an initial denaturation step of 15 min at 95°C and 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C (for PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3) or 60°C (for PMWaV5, PMWaV6, and PMWaV7), and 1 min at 72°C, then a final extension of 10 min at 72°C. Amplification products were analyzed by electrophoresis on 2.5% agarose gels in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and visualized under UV light following staining with ethidium bromide.

2.6. RACE PCR

Rapid amplification of cDNA 3'-ends (3'-RACE) and 5'-ends (5'-RACE) experiments were performed for viruses for which genome 5' and 3' ends were missing from the assemblies of HTS reads. The SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara, Beijing, China) was used following manufacturer's instructions. cDNAs were amplified by PCR using the universal primer A mix provided by the manufacturer and a virus-specific primer designed from the assembled genome sequence (Supplementary Table 2). The resulting PCR amplicons were analyzed by electrophoresis as described above. Bands corresponding to amplification products of the expected sizes were excised from the gels under UV light, purified using the Nucleospin PCR and Gel Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and ligated into the CloneJet PCR cloning vector (Thermo Scientific, California, USA). Inserts of the recombinant vectors were sequenced by standard Sanger sequencing (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) using a primer walking approach.

2.7. Search for recombination and phylogenetic analyses

Sequence alignments were performed using MAFFT v7.450 [37,38]. Inter-species recombination signals were searched using the RDP [39], GENECONV [40], BOOTSCAN [41], MAXCHI [42], CHIMERA [43], SISCAN [44] and 3SEQ [45] methods implemented in

the RDP5 program [46], using default settings. Recombination events were considered significant when detected by at least three different recombination detection methods.

For phylogenetic analyses, subsets of nucleotide sequences encoding viral RNA-dependant RNA polymerase (RdRp), heat shock protein 70 homolog (HSP70h) and coat protein (CP) sequences were obtained from the complete genome sequences, and conceptually translated into amino acid sequences. Homologous sequences of beet yellows virus (genus *Closterovirus*) were used as outgroups. Sequences alignments were performed using MAFFT v7.450 in Geneious Prime soft v2021.1 [38]. Maximum likelihood phylogenetic reconstruction was performed using FastTree v2.1.11 [47]. The LG substitution model with gamma-distributed rate among sites was used and the Shimodaira–Hasegawa-like test (SH-like) for branch support (1,000 replicates) was performed.

3. Results

3.1. Identification of known and novel ampeloviruses

HTS was performed on sample 16-1, generating 136.9M paired reads (~20,1Gb) and 4.9M reads (representing ~3,3Gb) from the Illumina short and Nanopore long read approaches, respectively. After trimming, the size of long reads ranged from 80 to 6,868 nt with a mean size of 529 nt, and short reads ranged from 80 to 151 nt with a mean size of 123 nt. A total of 97,021 contigs (ranging in size between 80 and 56,804 nt) was obtained from *de novo* assembly performed on both short and long reads using the hybrid assembly approach. Similarity searches against viral databases showed that 183 of these contigs displayed similarities with viral sequences (E value was always of 0). After aligning and merging the viral contigs, a second similarity search was performed and revealed the presence of six supercontigs (referred to as Contig-A to Contig-F) ranging in size between ~13 and 18kbp, with similarities in BLASTx to viruses from the genus *Ampelovirus* (Table 1). Other contigs with similarities with viruses from the *Vitivirus* (family *Betaflexiviridae* [48]), *Sadwavirus* (family *Secoviridae* [49,50]) and *Badnavirus* (family *Caulimoviridae* [21]) genera, were also obtained (data not shown).

Table 1. Characteristics of the contigs with similarities to ampeloviruses.

Supercontigs ID (Length bp)	Number of contigs	Contigs length (bp)	Number of reads	Cov $\geq 10^1$ (%)	Cov $\geq 100^1$ (%)	Mean depth	Most similar virus (BLASTx)	Protein accession numbers ²	Length reference (aa)	Identity (%) ³	Query cover (%)	Virus species
Contig-A (13,074)	67	86-13,073	42,491	99.99	98.29	415	Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	AIL56407	2,076	82.9	47	PMWaV1
Contig-B (16,199)	38	81-5,816	200,516	100	99.99	1,683	Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	QJQ80343	1,934	99.2	35	PMWaV2
Contig-C (13,229)	59	80-5,040	28,779	99.77	98.30	285	Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	QJQ80362	2,135	94.8	48	PMWaV3
Contig-D (12,971)	8	159-6,146	19,534	99.75	90.59	197	Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	QJQ80369	2,029	43.2	43	PMWaV5
Contig-E (17,440)	4	466-7,117	7,304	97.45	1.10	41	Pineapple mealybug wilt-associated virus 6	QZB90239	1,972	98.8	33	PMWaV6
Contig-F (18,388)	7	389-18,092	23,269	99.98	85.14	157	Grapevine leafroll-associated virus 3	QGU17997	1,058	38.6	15	PMWaV7

¹ Percent genome coverage at 10X and 100X.

² BLASTx locus identified always the ORF1a.

³ E value was always of 0.

The presence of a strand-switching primer (SSP) sequence and poly-A tail within some of the long reads allowed the identification of putative 5'- and/or 3'-ends of several assembled viral genomes. Using this method, we were able to identify the 5'-ends of five out of the six assembled genomes (except for Contig-D) and the 3'-ends of Contig-A and Contig-F. Using RACE PCR using custom primers (Supplementary Table 2) designed from the sequences of the contigs, the 5'-ends of Contig-D, Contig-E and Contig-F and the 3'-end of Contig-F were confirmed. Our attempts to obtain the 3'-ends of Contig-B, Contig-C, Contig-D and Contig-E remained unsuccessful. The presence of the six identified ampeloviruses in sample 16-1 was confirmed using RT-PCR assays performed with virus-specific primers (Supplementary Table 1).

3.2. Species identification and genome organization

The sizes of the six assembled ampelovirus genomes, including their 5' and 3' ends, ranged between 12,971 and 18,388 nt (Table 1 and Figure 1). These genomes shared a common organisation typical of either ampelovirus subgroup I (with seven ORFs) or subgroup II (with 10 or 11 ORFs) (Figure 1 and Supplementary Table 3).

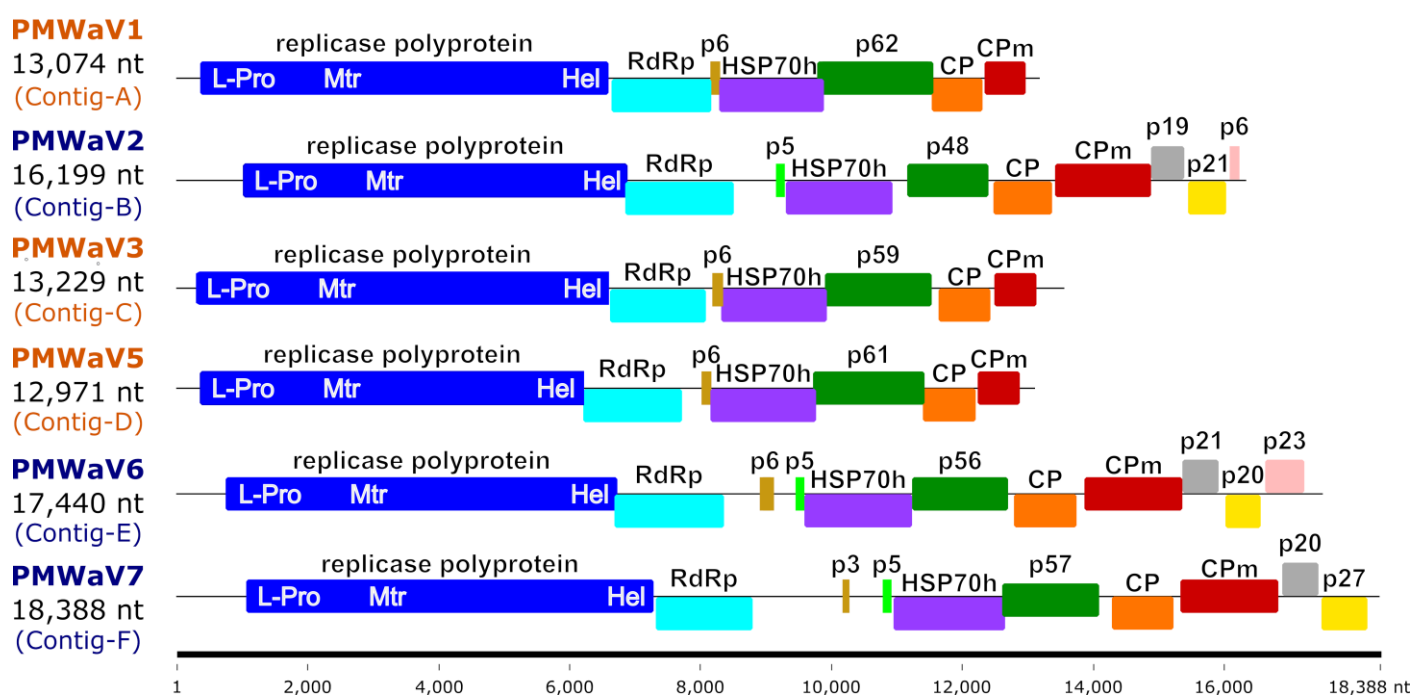


Figure 1. Schematic representation of the genomic organization of the six ampelovirus isolates sequenced in this work. ORFs are shown as coloured boxes. Size scale (in nucleotides) is provided at the bottom of the figure. The names of viruses belonging to ampelovirus subgroup I and subgroup II are coloured in blue and orange respectively. Gene abbreviations are as follows: L-Pro, leader papain-like protease; Mtr, methyltransferase; Hel, helicase; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; HSP70h, heat-shock protein 70 homolog; CP, coat protein; CPm, minor coat protein, and unknown genes.

The RdRp, HSP70h and CP amino acid sequences conceptually translated from the six assembled ampelovirus genomes were used in phylogenetic analyses to assign these genomes to existing or new ampelovirus species, following the current ICTV criteria for species demarcation in genus *Ampelovirus* (less than 75% aa identity [14]). RdRps, HSP70hs and CPs encoded by Contigs-A, -B, -C and -E displayed 86.4 to 99.2% identity with homologous proteins of previously characterized isolates of PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, and PMWaV6, respectively (Table 2). The four available PMWaV6 genomes from Hawaii, and the 16-1 isolate of PMWaV6 (PMWaV6-RUN), show size variability due to insertion/deletion, particularly between the ORFs encoding the RdRp and p6. The genome of PMWaV6-RUN (17,355 nt) displayed a 470nt deletion similar to the OP860297 isolate, but none of the other three isolates described in Hawaii, with range in size between 17,225 to 18,213 nt, has this deletion.

Table 2. Pairwise nucleotide and deduced amino acid sequence identities of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp), heat shock protein 70 homolog (HSP70h) and coat protein (CP) between the 16-1 Reunion isolates of PMWaVs and their closest ampelovirus relative.

ORF	Contig	Virus species	Accession numbers - Virus names ¹	Nucleotides identities (%) ²	Amino acid identities (%) ²
RdRp	A	PMWaV1	NC_010178 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	90.6	90.7
	B	PMWaV2	NC_043105 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	98.9	98.4
	C	PMWaV3	NC_043406 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	97.6	98.6
	D	PMWaV5	EF467922 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 5	85.6	85.7
	E	PMWaV6	MW269512 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 6	99.5	98.8
	F	PMWaV7	NC_004667 - Grapevine leafroll-associated virus 3	55.2	43.0
HSP70h	A	PMWaV1	NC_010178 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	88.9	86.4
	B	PMWaV2	NC_043105 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	97.5	95.9
	C	PMWaV3	NC_043406 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	97.2	94.8
	D	PMWaV5	EF467920 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 5	84.7	91.8
	E	PMWaV6	MW269512 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 6	99.3	99.1
	F	PMWaV7	NC_004667 - Grapevine leafroll-associated virus 3	55.2	41.2
CP	A	PMWaV1	NC_010178 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 1	91.1	94.9
	B	PMWaV2	NC_043105 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 2	99.5	99.2
	C	PMWaV3	NC_043406 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	97.2	97.3
	D	PMWaV5	NC_043406 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 3	66.6	60.6
	E	PMWaV6	MW269512 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 6	99.4	98.6
	F	PMWaV7	NC_022072 - Blackberry vein banding-associated virus	46.9	34.3

¹ The name of the isolate showing the best BlastP score is provided.

² Values below the current ICTV species discrimination criteria (<75% aa identity) are shown in bold.

RdRp and HSP70h sequences encoded by Contig-D shared respectively 85.7% and 91.8 % aa identity with their counterparts encoded by the PMWaV5 partial genome sequence (EF467920) described by [6], providing a strong indication that Contig-D corresponds to the complete genome of a Reunion isolate of PMWaV5 (PMWaV5-RUN), making it the first complete genome of a PMWaV5 isolate. Sequence comparisons for the CP could not be carried out since the PMWaV5 partial sequence (EF467920) does not encompass the ORF encoding the CP. The genome of PMWaV5-RUN displays the typical organisation of subgroup II ampeloviruses, with seven putative ORFs. ORF1a encodes a putative polyprotein of 226.8 kDa with the domains of a papain-like protease (L-Pro), a methyltransferase (Mtr) and a helicase (Hel) involved in replication [51]. ORF1b encodes a putative 52.3 kDa protein with the conserved motifs of a RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). ORF2 encodes a putative movement protein of 5.7 kDa [52]. ORF3, ORF4, ORF5 and ORF6 encode a putative HSP70h (58.4 kDa), p61 (61.2 kDa), CP (30 kDa) and CPm (24.3 kDa), respectively.

The RdRp and HSP70h conceptually translated from the complete genome sequence corresponding to Contig-F (18,388 nt) were most closely related to those of grapevine leafroll-associated virus 3 (GRLaV3, NC004667), with 43.0% and 41.2% aa identities, respectively, whereas the CP was most closely related to that of blackberry vein banding-associated virus (BVBaV, NC022072), with 34.3% aa identity (Table 2). Therefore, following the criterion for species demarcation, the complete genome sequence assembled from Contig-F belongs to a new subgroup I ampelovirus for which the name pineapple mealybug wilt-associated virus 7 (PMWaV7) is proposed. ORF1a, encodes a putative polyprotein of 219 kDa with the domains a papain-like protease (L-Pro), a methyltransferase (Mtr) and a helicase (Hel); ORF1b encodes a putative RdRp of 53.8 kDa; ORFs 2 and 3 encode putative proteins of 3.3 kDa (p3) and 4.6 kDa (p5), respectively; ORF4 encodes a putative HSP70h of 60.2 kDa; ORF5 encodes a putative protein of 56.8 kDa (p57); ORF6 encodes a putative CP of 34.3 kDa; ORF7 encodes a putative CPm of (52.8 kDa). ORF8 and ORF9

encode putative proteins of 16.9 kDa (p20) and 26.5 kDa (p27) which are potentially involved in systemic transport and RNA silencing suppression, respectively [51]. No alkylation B (AlkB) domain was found in the replication-related proteins of the Reunion isolates of PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PMWaV5, PMWaV6 and PMWaV7. No inter-species recombination was detected between the isolates of these six PMWAs.

3.3. Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses using RdRp, HSP70h or CP aa sequences showed the placement of PMWaV2-RUN, PMWaV6-RUN and PMWaV7-RUN in *Ampelovirus* subgroup I and that of PMWaV1-RUN, PMWaV3-RUN and PMWaV5-RUN in subgroup II (Figure 2). Interestingly, subgroup II ampeloviruses (PMWaV1-RUN, PMWaV3-RUN and PMWaV5-RUN) were more closely related to subgroup II ampeloviruses infecting other crops than to subgroup I ampeloviruses infecting pineapple (Figure 2).

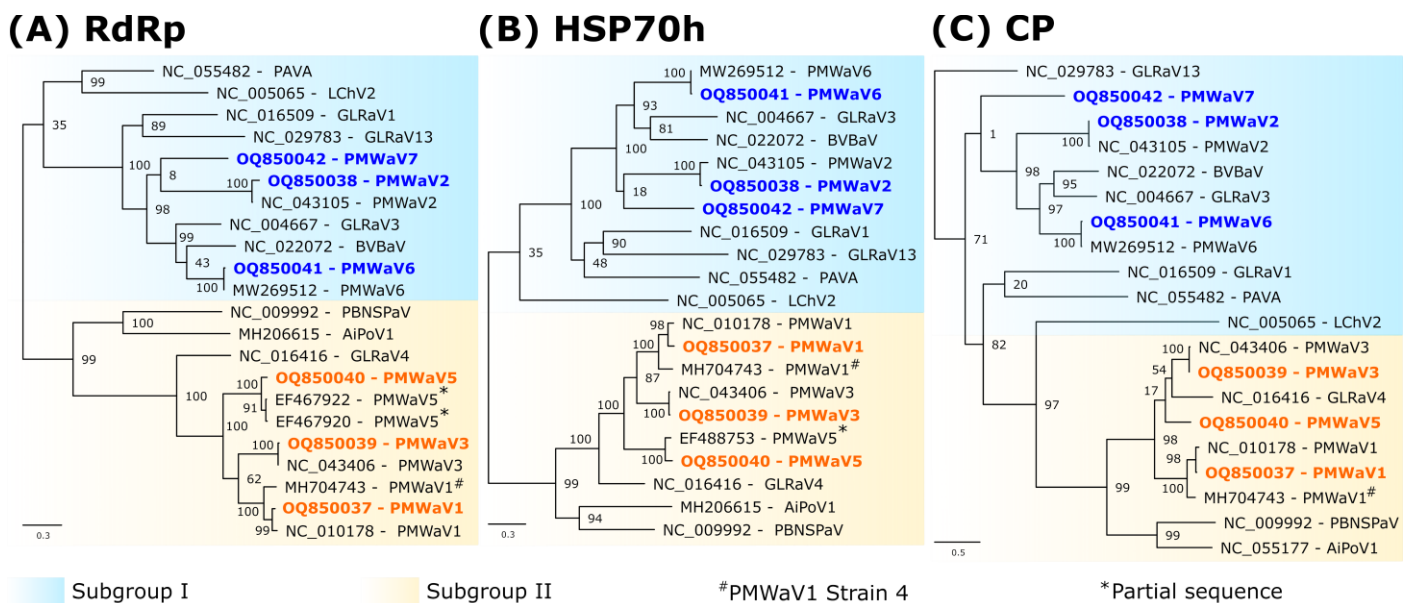
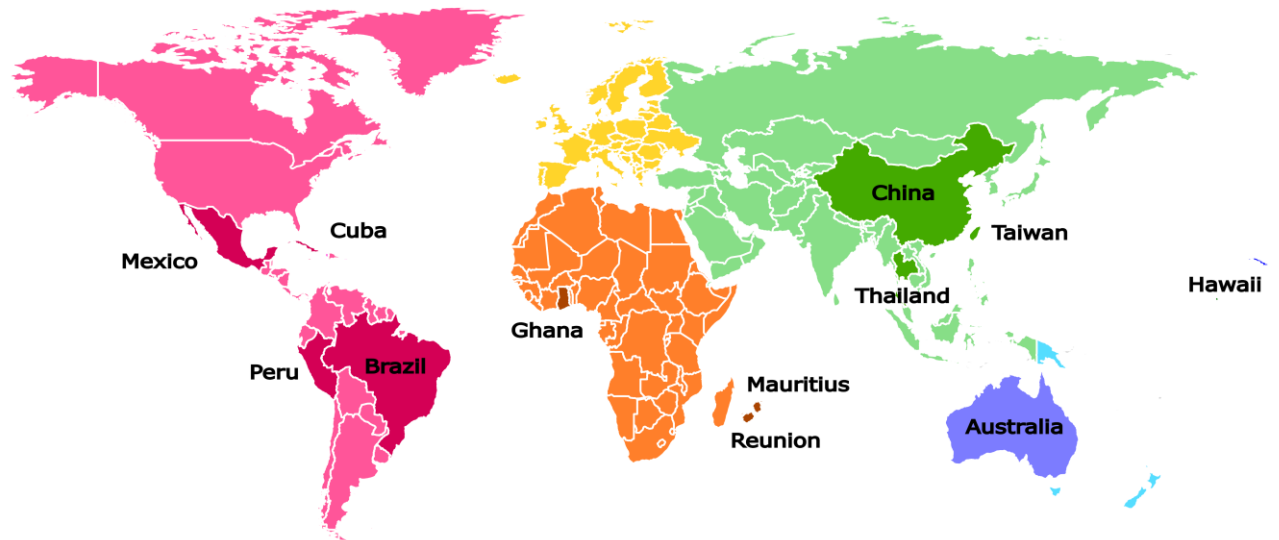
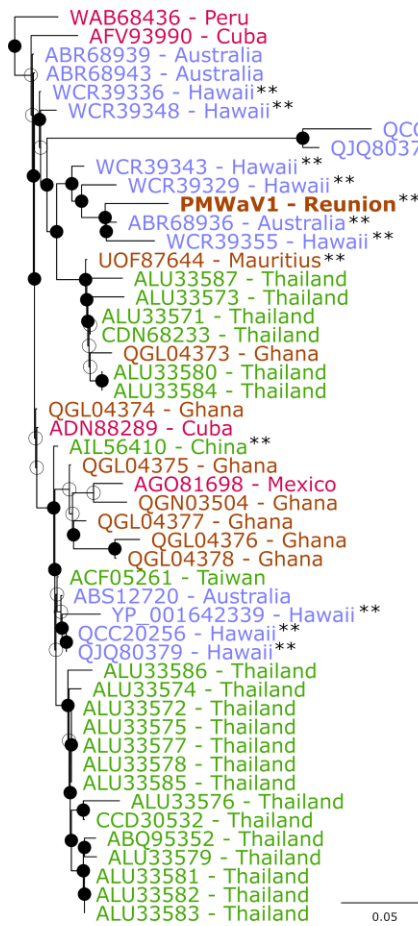


Figure 2. Maximum-likelihood phylogenetic trees showing the relationships of pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaV1 to 7) amino acid sequences with those of selected members of the *Ampelovirus* genus corresponding to the RdRp (A), HSP70h (B) and CP (C). PMWAs sequences obtained during this study are indicated in bold font. Values associated with nodes indicate SH-like local support for the branches to their left. The scale bars show the number of substitutions per site. The trees are rooted using beet yellows virus (BYV, *Closterovirus*). *Ampelovirus* subgroups I and II are indicated using blue and yellow rectangles, respectively. Partial sequences are indicated with asterisks. PMWaV4 previously reported as another species was recently classified as a strain of PMWaV1 and is indicated with a hash. For virus acronyms, see Supplementary Table 4.

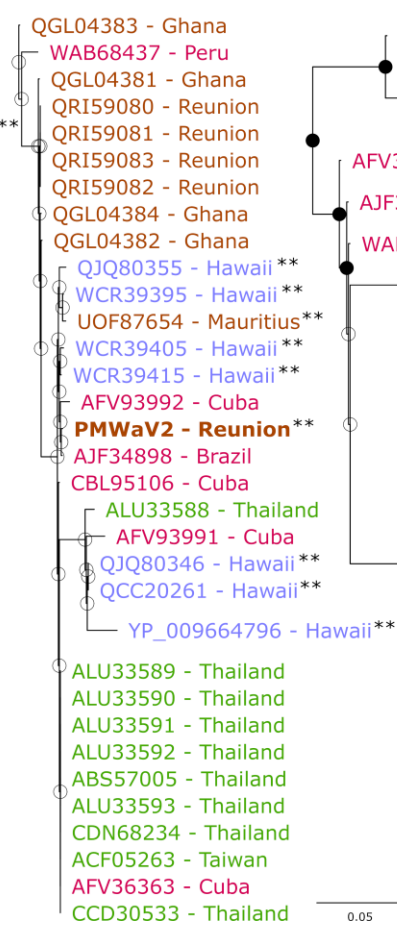
We took advantage of the availability in public databases of PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 HSP70h sequences originating from samples collected in various locations covering most pineapple growing regions to carry out a phylogeographic analysis of the diversity of these viruses. We used respectively 48, 32 and 21 publicly available HSP70h aa sequences for PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 (Figure 3).



(A) PMWaV1



(B) PMWaV2



(C) PMWaV3



Figure 3. Maximum-likelihood phylogenetic trees of the HSP70h amino acid sequences of pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (A), 2 (B) and 3 (C) from Reunion along with sequences available from GenBank. Sequences are colored according to their geographical origin and the color legend is indicated on the map on top of the figure. Isolates from Reunion are indicated in brown and in bold. HSP70h sequences from complete genome sequences are indicated with two black asterisks. Bootstrap values equal or greater than 70% are indicated by solid black circles. PMWaV3 (YP_009666005), PMWaV6 (QZB90243) and PMWaV1 (YP_001642339) isolates from Hawaii were used to root the PMWaV1, 2 and 3 trees, respectively. The scale bars show the number of substitutions per site.

There was no clear geographic structuring of the diversity, regardless of the considered *Ampelovirus* species. Sequences originating from given countries, such as PMWaV1 sequences originating from Hawaii, were sometimes scattered throughout the phylogenies and/or were more closely related to sequences originating from distant locations than to sequences originating from nearby locations. For example, the isolate PMWaV1-RUN was more closely related to isolates from Hawaii and Australia than to an isolate from nearby Mauritius (Figure 3A). Likewise, the isolate PMWaV2-RUN described in this work grouped with highly similar sequences (minimum percentage aa identity of 99.51%) originating from Cuba, Mauritius, Thailand, Taiwan, Brazil and Hawaii, and was more distantly related to previously described isolates from Reunion [47] (Figure 3B). Lastly, the isolate PMWaV3-RUN grouped with isolates from various locations such as Australia, Cuba, Taiwan and Hawaii (Figure 3C).

3.4. Comparison between the short and long read approaches

All the reads obtained using the two HTS approaches were mapped back to the six assembled ampelovirus genomes and the coverage statistics were calculated (Table 3). Between 7,235 and 198,147 short reads and 17 and 2,374 long reads were mapped, depending on the virus considered. For both approaches, PMWaV2-RUN was the virus with the highest mean sequencing depth (N=1,606 and 77 respectively). For short reads, all the genomes were entirely covered and 97.1% to 99.8% of their length was covered at a 10X sequencing depth. Due to the much lower number of reads obtained with the long read approach, sequencing depths are drastically lower as compared to the short read approach (Table 3). Some genomes were relatively well covered, such as those of PMWaV1-RUN, PMWaV3-RUN and PMWaV7-RUN with a mean sequencing depth of 53.3, 10.1 and 8.3 respectively, and a coverage at 10X sequencing for between 30.4 and 82.1 of the genome. On the opposite, the genomes of PMWaV5-RUN and PMWaV6-RUN were poorly covered, with mean sequencing depths of 0.4 and 1.5, respectively, because of the very few reads that were obtained for these viruses.

Table 3. Read mapping statistics with short and long read approaches of the Reunion isolates of PMWavS genomic sequences.

Virus species	Approach	Number of reads	Cov > 1 ¹ (%)	Cov ≥ 10 ¹ (%)	Mean depth
PMWaV1	short read	41,417	100	99.8	361.0
	long read	1,074	100	82.1	53.3
PMWaV2	short read	198,147	100	100	1,606
	long read	2,374	99.7	72.0	77.0
PMWaV3	short read	28,561	100	99.7	275.0
	long read	218	94.8	35.5	10.1
PMWaV5	short read	19,517	99.9	99.8	197.0
	long read	17	18.8	0.0	0.4
PMWaV6	short read	7,235	99.9	97.1	39.4
	long read	69	53.9	3.7	1.5
PMWaV7	short read	22,937	99.9	99.7	148.8
	long read	332	94.0	30.4	8.3

¹ Percent genome coverage at 1X and 10X.

We further analyzed the distribution of short and long reads along the genomes of PMWaV1, 2, 3, 5, 6 and 7 (Figure 4).

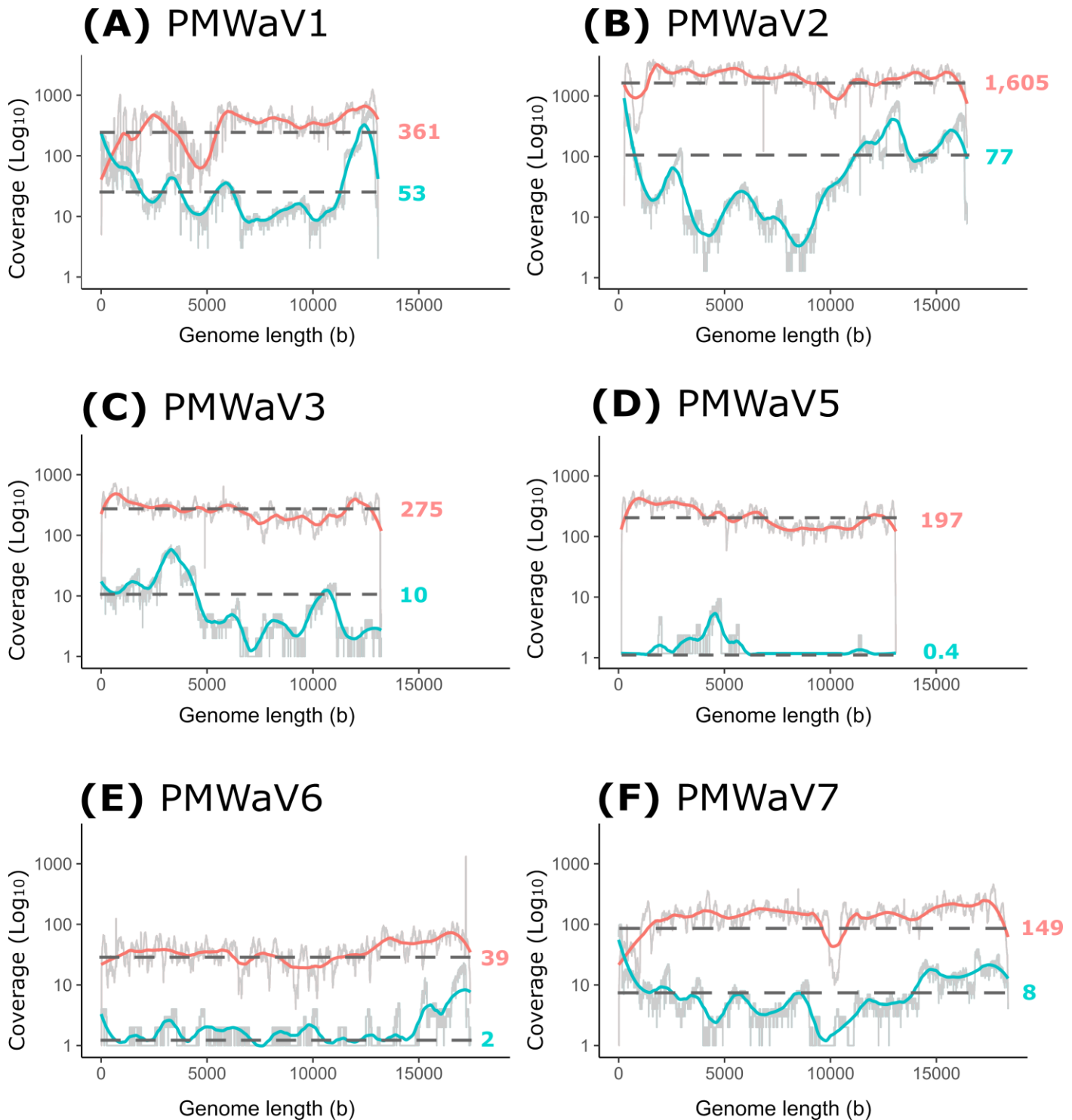


Figure 4. Mean sequencing depth for short reads (red curves) and long reads (blue curves) along the genomes of PMWaV1 (A), PMWaV2 (B), PMWaV3 (C), PMWaV5 (D), PMWaV6 (E) and PMWaV7 (F). The x-axis represents the genomic position (in nt) and the y-axis the fold coverage (Log₁₀ scale). Colored curves were obtained after the smoothing (window size of 20) of the raw depth (light grey). Mean depth values are indicated on the right of each curve.

The number of short reads was quite stable along genome sequences, except for PMWaV1 and, to a lesser extent, PMWaV7 (Figure 4). On the contrary, large variations in coverage were observed for long reads along the genomes of all six studied viruses, with relatively higher depths for the 5' and 3' ends of the genomes, except for PMWaV5 (Figure

4D). Indeed, sequences were obtained (5' end essentially) for seven of the 12 genome ends for long reads sequencing (in some cases with low coverage), whereas sequences of nine of the 12 genome ends were obtained using short reads sequencing (Supplementary Table 2). Very few reads were obtained for PMWaV5 and none could be mapped to the genome ends, using either long or short reads sequencing.

Regarding the proportion of viral bases in relation to the total number of sequenced bases, important differences were observed between viral genomes (Figures 5A and B).

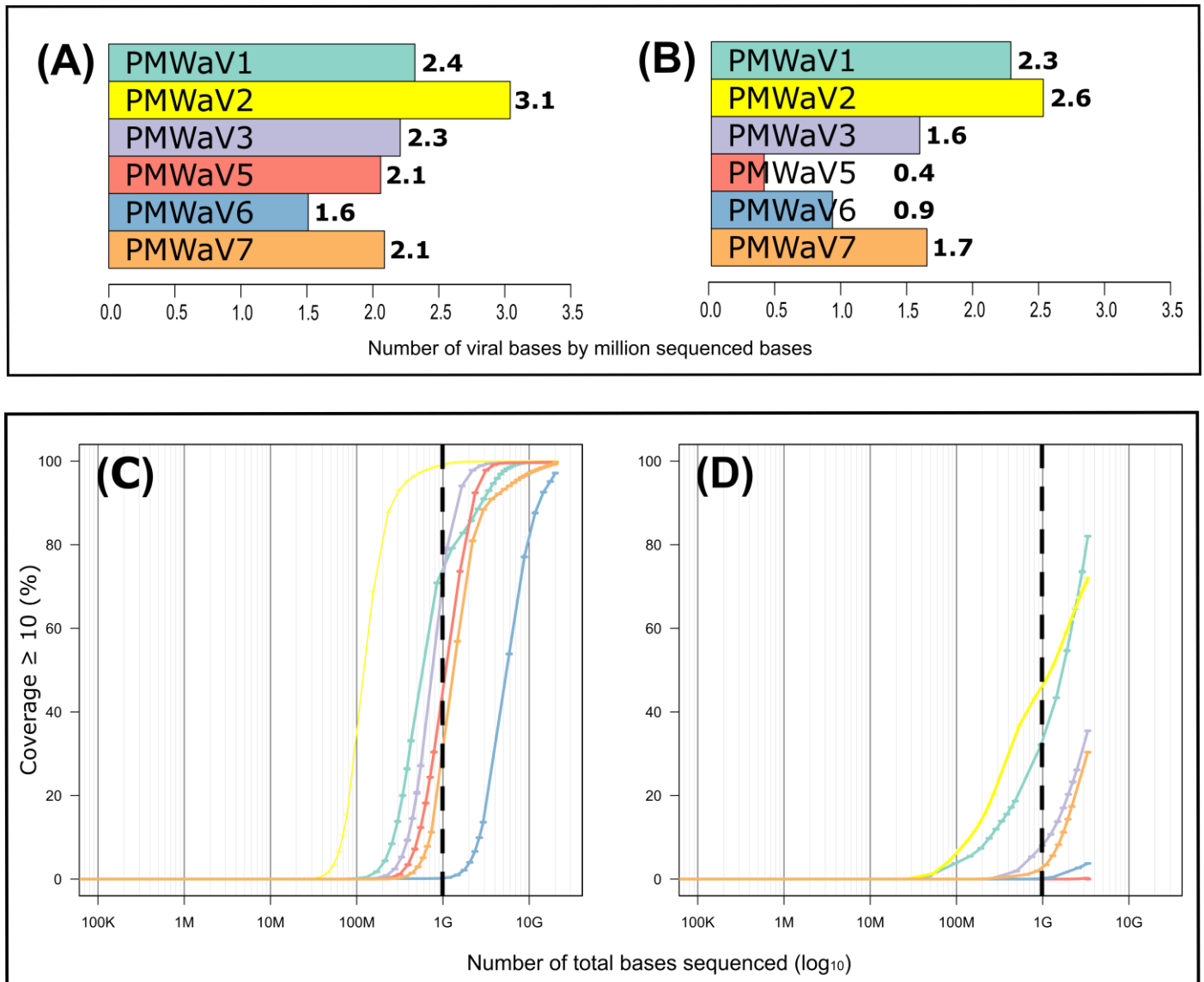


Figure 5. Proportion of viral bases per millions of sequenced bases for each pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) for the short (A) and long reads (B) approaches, and intraplotation of sequence coverage (10X, y-axis) for each PMWaV for the short (C) and long (D) reads approaches according to the number of sequenced bases (x-axis in \log_{10} scale).

For short reads (Figure 5A) this proportion ranged between 1.6 bases per million of sequenced bases for PMWaV6 and 3.1 for PMWaV2. For long reads, it ranged between 0.4 for PMWaV5 and 2.6 for PMWaV2. If this proportion was considered a proxy of the viral titer, PMWaV2 would be the virus with the highest viral load in the sampled plant and PMWaV5 and 6 the viruses with the lowest viral loads.

In order to evaluate the correlation between the sequencing effort (i.e. the amount of raw sequences obtained per sample) and genome coverage, we calculated the sequencing

depth (i.e. the number of times a nucleotide is read during sequencing) and breadth (i.e. the proportion of nucleotides in the consensus sequence relative to the length of the complete genome sequence) for sets of subsampled reads (Figure 5C and D). We obtained the distribution of the expected genome coverage (y-axis on Figures 5C and D) for every virus and for increasing sequencing efforts (x-axis on Figures 5C and D). A total of 20 Gb of sequenced data for the short reads, corresponding to the overall number of bases obtained through this approach (Figure 5), revealed that all ampelovirus genomes exhibited an almost complete 10X depth (a minimum of 97% for PMWaV6), but a decrease in coverage breadth was observed when reducing the sequencing effort. Importantly, the slope of the curve (representing the rate at which bases are covered when increasing the number of reads) was mostly similar for all six viruses (Figure 5C). For a sequencing effort of 1 Gb, corresponding to a common Illumina run in which 96 samples would have been multiplexed, 10X sequencing depth would range between 35% and 95% for all viral genomes except PMWaV6, meaning that although not all genome regions would be properly covered, five of the viral genomes would have at least been detected (with an estimation of 8,000 to 188,000 minimum reads for all of the six species). Only PMWaV6 may remain undetected, with no read expected at 1Gb. For this virus, the intrapolation curve showed that the breadth of coverage reached 50% of the genome for a 3.5 Gb sequencing effort (Figure 5D).

For the long read approach, a 3 Gb sequencing effort corresponding to the total number of sequenced bases obtained when combining the two runs, did not allow the complete sequencing of any viral genome and resulted in a 10X sequencing depth for 0 to 82% of the nucleotide positions depending on the virus considered (Figure 5D). Very few reads were obtained for PMWaV5 (N=17) for which no position was covered with a 10X sequencing depth. Contrary to the situation encountered with the short read approach, the slopes of the curves differed slightly between viruses. If the sequencing effort was reduced to 1Gb, the proportion of the viral genomes sequenced at a 10X depth would be drastically reduced: the genomes of PMWaV5 and PMWaV6 would not be sequenced and the 10X breadth of coverage would be below 10% for that of PMWaV3 and PMWaV7. PMWaV1 and PMWaV2 would display genome breadths with a 10X depth around 30% and 50%, respectively. The estimated number of reads that would be obtained for each of the six viruses targeted by this study would range from 390 to 1,650.

4. Discussion

In this study, we recovered near complete genome sequences of isolates from six ampeloviruses infecting a wilt-diseased pineapple plant in Reunion, using two different HTS approaches. One sequence obtained in this study represents the first complete genome sequence of PMWaV5, and another is the complete genome sequence of a new ampelovirus, for which we propose the name pineapple wilt-associated virus 7 (PMWaV7). Four of these viruses (PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 and PMWaV6) had been described previously [50]. PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 have been previously reported in Reunion from wilt-diseased pineapple plants [48]. Our work provides the first evidence that PMWaV5, PMWaV6 and PMWaV7 isolates are also present in Reunion, adding to the complexity of the etiology of MWP in Reunion. Mixed viral infections have been repeatedly reported in pineapple. Indeed, contigs with similarities with viruses from the *Vitivirus* (family *Betaflexiviridae*, [53]), *Sadwavirus* (family *Secoviridae*, [49,50]) and *Badnavirus* (family *Caulimoviridae*, [21]) genera were also identified from the 16-1 pineapple sample used in this work, providing evidence that this plant was infected by at least nine viruses from four distinct families. Vegetative propagated crops such as pineapple are known to accumulate viruses [17,48,50,54] because they do not undergo sexual reproduction, which acts as natural sanitation since the majority of plant viruses are not seed-transmitted [55]. Co-infections by large numbers of viruses may favour synergistic effects which, in the case of pineapple, could influence the severity of MWP symptoms.

Pineapple was introduced throughout the tropics and subtropics from its South American centre of origin (Paraguay, southern Brazil and northern Argentina) in less than 600 years through navigation routes [56-58], likely resulting in the spread of pineapple pests and diseases worldwide. The intensification of exchanges of plant material occurred, also contributing to the spread of these pathogens and pests. Indeed, our phylogeographic analyses did not provide evidence for a geographical structuring of PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 isolates, supporting the hypothesis that PMWaVs have mainly been disseminated through recurrent exchanges of infected germplasm. In the future, the analysis of larger numbers of samples collected worldwide, including ancient samples conserved in herbaria throughout the world, would help refine this scenario and better understand the migration routes of PMWaVs and of other pineapple viruses. A similar approach proved successful for unravelling the origin of viruses of grasses [59], grapevine [60] and cassava [61].

Our previous studies on PMWaVs [18,50,62,63] highlighted the lack of knowledge about the diversity of viruses infecting pineapple and the potential of HTS to help fill this gap. In this study, we used a combination of HTS short and long reads to tackle this issue. Whereas the first approach requires access to Illumina sequencing devices usually available in medium to large laboratories, the second uses the Oxford Nanopore MinION sequencing device, which is easily accessible to single laboratories. We found that one of the limitations of the long read sequencing approach described in this work lies in the use of a cDNA-PCR barcoding kit designed for the sequencing of polyadenylated RNAs. Genomic RNAs of ampeloviruses are not polyadenylated, therefore we somehow circumvented this problem by priming the poly-T primer in A-rich regions of ampelovirus genomes. It is likely that priming was not as effective as with poly(A) templates, which has probably reduced efficiency and could possibly account for the low numbers of long reads that were obtained for all six ampeloviruses studied in this work. Nevertheless, the combination of the short reads and long reads approaches enabled the assembly of complete or near complete genomes of PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PMWaV5, PMWaV6 and PMWaV7. If we consider the pineapple sample used in this work as an extreme case of co-infection, the approach described in this paper could be considered a model for the development of HTS-based viral indexing and the sequencing of complete viral genomes. It is noteworthy that the sequences of most 5' ends and some of the 3' ends of the six ampelovirus genomes studied in this work were retrieved from HTS data, avoiding time-consuming RACE PCRs.

5. Conclusion

Our results underline the existence of an important viral diversity among ampeloviruses infecting pineapple in Reunion. Additional work is now required to assess the prevalence of these viruses in this Island, their role in the etiology of MWP, and to design appropriate disease management methods for the control of MWP.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www. Supplementary Table 1. Sequence of the primers used in RT-PCR assays for the detection of PMWaVs. Supplementary Table 2. Identification of the 5' and 3' ends of the genome sequences of PMWaV species using RACE PCR and long read approaches. Supplementary Table 3. Genomic organization of PMWaV sequences described on pineapple in Reunion. Supplementary Table 4. List of sequences used for pairwise identity comparisons and phylogenetic analysis.

Author Contributions: D.M., J.M.L., P.L. designed the experiments; D.M., N.C., E.F., S.M. performed the experiments; D.M., P.L., D.F., T.C., analyzed the data; D.M., P.L., P.Y.T., J.M.L. wrote the initial version of the manuscript. D.M., P.L., P.Y.T., J.M.L. have revised the initial draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was co-funded by the European Union (ERDF, INTERREGV), the Conseil Régional de La Réunion, CIRAD and ANSES, and conducted on the Plant Protection Platform (3P, IBISA).

Please add: "This research received no external funding"

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: New sequences described in this paper were deposited on GenBank under accession numbers OQ850037-OQ850042.

Acknowledgments: We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing resources through its Galaxy server and the European Cost Action FA1407.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FAO/STAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO/STAT statistics database* **2023**.
2. Sether, D.M.; Melzer, M.J.; Busto, J.; Zee, F.; Hu, J.S. Diversity and Mealybug Transmissibility of Ampeloviruses in Pineapple. *Plant Dis.* **2005**, *89*, 450-456, doi:10.1094/PD-89-0450.
3. Carter, W. The influence of plant nutrition on susceptibility of pineapple plants to mealybug wilt. *Phytopathology* **1945**, *35*, 316-323.
4. Carter, W. The systemic phytotoxemias: Mealybug wilt of pineapple. In *Insects in relation to plant disease*, Carter, W., Ed.; Interscience: New York, 1962; pp. 238-265.
5. Carter, W. Mealybug wilt of pineapple; a reappraisal. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1963**, *105*, 741-764, doi:10.1111/j.1749-6632.1963.tb42961.x.
6. Gambley, C.F.; Steele, V.; Geering, A.D.W.; Thomas, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. *Australasian Plant Pathology* **2008**, *37*, 95-105, doi:10.1071/ap07096.
7. Sether, D.M.; Hu, J.S. Yield Impact and Spread of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 and Mealybug Wilt of Pineapple in Hawaii. *Plant Dis.* **2002**, *86*, 867-874, doi:10.1094/PDIS.2002.86.8.867.
8. Larsen, L.D. Diseases of pineapple. Hawaii Sugar Planters Association Pathol. Physiol. Ser. *Experimental Station Bulletin* **1910**, *10*, 1-72.
9. Ito, K. Additional immunological evidence supporting the virus nature of mealybug wilt. *Pineapple Res. Inst. News* **1962**, *10*, 158-162.
10. Gunasinghe, U.; German, T. Association of virus-particles with mealybug-wilt of pineapple. *Phytopathology*, 1986; pp. 1073-1073.
11. Gunasinghe, U.; German, T. Further characterization of virus associated with mealybug-wilt of pineapple. *Phytopathology*, 1987; pp. 1776-1776.
12. Melzer, M.J.; Karasev, A.V.; Sether, D.M.; Hu, J.S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 1-7, doi:10.1099/0022-1317-82-1-1.
13. Gunasinghe, U.; German, T. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. *Phytopathology* **1989**, *79*, 1337-1341.
14. Martelli, G.P.; Agranovsky, A.A.; Bar-Joseph, M., B., D.; Candresse, T.; Coutts, R.H.A.; Dolja, V.V.; Hu, J.S.; Jelkmann, W.; Karasev, A.V.; et al. Closteroviridae. *Virus Taxonomy* **2011**, 987-1001.
15. Fuchs, M.; Bar-Joseph, M.; Candresse, T.; Maree, H.J.; Martelli, G.P.; Melzer, M.J.; Menzel, W.; Minafra, A.; Sabanadzovic, S.; Report Consortium, I. ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae. *J. Gen. Virol.* **2020**, *101*, 364-365, doi:10.1099/jgv.0.001397.

16. Maree, H.J.; Almeida, R.P.P.; Bester, R.; Chooi, K.M.; Cohen, D.; Dolja, V.V.; Fuchs, M.F.; Golino, D.A.; Jooste, A.E.C.; Martelli, G.P.; et al. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*, doi:10.3389/fmicb.2013.00082.
17. Dey, K.K.; Green, J.C.; Melzer, M.; Borth, W.; Hu, J.S. Mealybug Wilt of Pineapple and Associated Viruses. *Horticulturae* **2018**, *4*, 52.
18. Larrea-Sarmiento, A.; Olmedo-Velarde, A.; Wang, X.; Borth, W.; Matsumoto, T.K.; Suzuki, J.Y.; Wall, M.M.; Melzer, M.; Hu, J. A novel ampelovirus associated with mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus*). *Virus Genes* **2021**, doi:10.1007/s11262-021-01852-x.
19. Herrbach, E.; Le Maguet, J.; Hommay, G. CHAPTER 11: Virus Transmission by Mealybugs and Soft Scales (Hemiptera: Coccoidea). In *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*; 2016; pp. 147-161.
20. Sether, D.M.; Borth, W.B.; Melzer, M.J.; Hu, J. Spatial and Temporal Incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in Pineapple Planting Blocks. *Plant Dis.* **2010**, *94*, 196-200, doi:10.1094/PDIS-94-2-0196.
21. Sether, D.M.; Hu, J.S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* **2002**, *92*, 928-935.
22. Adams, I.P.; Glover, R.H.; Monger, W.A.; Mumford, R.; Jackeviciene, E.; Navalinskiene, M.; Samutiene, M.; Boonham, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant Pathol.* **2009**, *10*, 537-545, doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x.
23. Roossinck, M.J. Deep Sequencing for Discovery and Evolutionary Analysis of Plant Viruses. *Virus Res.* **2017**, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.019>.
24. Wu, Q.; Ding, S.-W.; Zhang, Y.; Zhu, S. Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. *Annual review of phytopathology* **2015**, *53*, 425-444, doi:doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120030.
25. Green, J.C.; Rwahnihi, M.A.; Olmedo-Velarde, A.; Melzer, M.J.; Hamim, I.; Borth, W.B.; Brower, T.M.; Wall, M.; Hu, J.S. Further genomic characterization of pineapple mealybug wilt-associated viruses using high-throughput sequencing. *Tropical Plant Pathology* **2020**, *45*, 64-72, doi:10.1007/s40858-019-00330-y.
26. Marais, A.; Murolo, S.; Faure, C.; Brans, Y.; Larue, C.; Maclot, F.; Massart, S.; Chiumenti, M.; Minafra, A.; Romanazzi, G.; et al. Sixty Years from the First Disease Description, a Novel Badnavirus Associated with Chestnut Mosaic Disease. *Phytopathology*® **2021**, *111*, 1051-1058, doi:10.1094/phyto-09-20-0420-r.
27. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2014**, *30*, 2114-2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
28. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial genomics* **2017**, *3*, e000132, doi:10.1099/mgen.0.000132.
29. De Coster, W.; D'Hert, S.; Schultz, D.T.; Cruys, M.; Van Broeckhoven, C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2018**, *34*, 2666-2669, doi:10.1093/bioinformatics/bty149.
30. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology* **2012**, *19*, 455-477, doi:10.1089/cmb.2012.0021.
31. Rouard, M.D., A.; Droc, G.; Sarah, G.; Dufayard, J.F.; Guignon, V.; Hamelin, C.; Homa, F.; de Lamotte, F.; Larmande, P.; Lariviere, D.; Sabot, F.; Sempere, G.; Summo, M.; Pitollat, B.; This, D.; Bocs, S.; Ruiz, M. The South Green Bioinformatics platform. In *Proceedings of the Plant and Animal Genome, PAG XXII., San Diego (USA), 11-15 Jan 2014, 2014*.
32. Masoudi-Nejad, A.; Tonomura, K.; Kawashima, S.; Moriya, Y.; Suzuki, M.; Itoh, M.; Kanehisa, M.; Endo, T.; Goto, S. EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic acids research* **2006**, *34*, W459-462, doi:10.1093/nar/gkl066.

33. Walker, B.J.; Abeel, T.; Shea, T.; Priest, M.; Abouelliel, A.; Sakthikumar, S.; Cuomo, C.A.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Young, S.K.; et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* **2014**, *9*, e112963, doi:10.1371/journal.pone.0112963.
34. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2009**, *25*, 1754-1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
35. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2018**, *34*, 3094-3100, doi:10.1093/bioinformatics/bty191.
36. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; Subgroup, G.P.D.P. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2009**, *25*, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
37. Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* **2002**, *30*, 3059-3066, doi:10.1093/nar/gkf436.
38. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* **2013**, *30*, 772-780, doi:10.1093/molbev/mst010.
39. Martin, D.; Rybicki, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2000**, *16*, 562-563, doi:10.1093/bioinformatics/16.6.562.
40. Padidam, M.; Sawyer, S.; Fauquet, C.M. Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination. *Virology* **1999**, *265*, 218-225, doi:<https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>.
41. Mika O. Salminen, J.K.C., Donald S. Burke, and Francine E. McCutchan. Identification of Breakpoints in Intergenotypic Recombinants of HIV Type 1 by Bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1995**, *11*, 1423-1425, doi:10.1089/aid.1995.11.1423.
42. Smith, J.M. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* **1992**, *34*, 126-129, doi:10.1007/bf00182389.
43. Posada, D.; Crandall, K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 13757-13762, doi:10.1073/pnas.241370698.
44. Gibbs, M.J.; Armstrong, J.S.; Gibbs, A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2000**, *16*, 573-582, doi:10.1093/bioinformatics/16.7.573.
45. Boni, M.F.; Posada, D.; Feldman, M.W. An Exact Nonparametric Method for Inferring Mosaic Structure in Sequence Triplets. *Genetics* **2007**, *176*, 1035-1047, doi:10.1534/genetics.106.068874.
46. Martin, D.P.; Varsani, A.; Roumagnac, P.; Botha, G.; Maslamoney, S.; Schwab, T.; Kelz, Z.; Kumar, V.; Murrell, B. RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus evolution* **2021**, *7*, doi:10.1093/ve/veaa087.
47. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular biology and evolution* **2009**, *26*, 1641-1650, doi:10.1093/molbev/msp077.
48. Massé, D.; Cassam, N.; Hostachy, B.; Iskra-Caruana, M.-L.; Darnaudery, M.; Lefeuvre, P.; Lett, J.-M. First Report of Three Pineapple Mealybug Wilt-Associated Viruses in Queen Victoria Pineapples in Reunion Island. *Plant Dis.* **2021**, *0*, PDIS-05-20-1068-PDN, doi:10.1094/pdis-05-20-1068-pdn.
49. Larrea-Sarmiento, A.; Olmedo-Velarde, A.; Green, J.C.; Al Rwahnih, M.; Wang, X.; Li, Y.H.; Wu, W.; Zhang, J.; Matsumoto, T.K.; Suzuki, J.Y.; et al. Identification and complete genomic sequence of a novel sadwavirus discovered in pineapple (*Ananas comosus*). *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1245-1248, doi:10.1007/s00705-020-04592-9.
50. Larrea-Sarmiento, A.E.; Olmedo-Velarde, A.; Wang, X.; Borth, W.; Domingo, R.; Matsumoto, T.K.; Suzuki, J.Y.; Wall, M.M.; Melzer, M.J.; Hu, J. Genetic Diversity of Viral Populations Associated with Ananas Germplasm and Improvement of Virus Diagnostic Protocols. *Pathogens (Basel, Switzerland)* **2022**, *11*, doi:10.3390/pathogens11121470.
51. Dolja, V.V.; Kreuze, J.F.; Valkonen, J.P.T. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* **2006**, *117*, 38-51, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.002>.

52. Peremyslov, V.V.; Pan, Y.W.; Dolja, V.V. Movement Protein of a Closterovirus Is a Type III Integral Transmembrane Protein Localized to the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 3704-3709, doi:10.1128/JVI.78.7.3704-3709.2004.
53. Massé, D.; Filloux, D.; Candresse, T.; Massart, S.; Marais, A.; Verdin, E.; Cassam, N.; Fernandez, E.; Roumagnac, P.; Teycheney, P.Y.; et al. Identification of a novel vitivirus from pineapple in Reunion Island. *Arch. Virol.* **2022**, *167*, 2355-2357, doi:10.1007/s00705-022-05512-9.
54. Moreno, I.; Rodríguez-Arévalo, K.A.; Tarazona-Velásquez, R.; Kondo, T. Occurrence and distribution of pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs) in MD2 pineapple fields in the Valle del Cauca Department, Colombia. *Tropical Plant Pathology* **2023**, *48*, 217-225, doi:10.1007/s40858-023-00559-8.
55. Bradamante, G.; Mittelsten Scheid, O.; Incarbone, M. Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell* **2021**, *33*, 2523-2537.
56. Paull, R.E.; Duarte, O. *Tropical Fruits Volume I. Crop Production Science, Horticulture*; CABI Publishing: Wallingford, UK, 2011.
57. Zanella, C.M.; Janke, A.; Palma-Silva, C.; Kaltchuk-Santos, E.; Pinheiro, F.G.; Paggi, G.M.; Soares, L.E.S.; Goetze, M.; Büttow, M.V.; Bered, F. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* **2012**, *35*.
58. Joy, P.; Anjana, R. Evolution of pineapple. *Pineapple Research Station* **2015**.
59. Malmstrom, C.M.; Shu, R.; Linton, E.W.; Newton, L.A.; Cook, M.A. Barley yellow dwarf viruses (BYDVs) preserved in herbarium specimens illuminate historical disease ecology of invasive and native grasses. *Journal of Ecology* **2007**, *95*, 1153-1166.
60. Rwahni, M.A.; Rowhani, A.; Golino, D.A.; Islas, C.M.; Preece, J.E.; Sudarshana, M.R. Detection and genetic diversity of Grapevine red blotch-associated virus isolates in table grape accessions in the National Clonal Germplasm Repository in California. *Can. J. Plant Pathol.* **2015**, *37*, 130-135, doi:10.1080/07060661.2014.999705.
61. Rieux, A.; Campos, P.; Duvermy, A.; Scussel, S.; Martin, D.; Gaudeul, M.; Lefeuvre, P.; Becker, N.; Lett, J.-M. Contribution of historical herbarium small RNAs to the reconstruction of a cassava mosaic geminivirus evolutionary history. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 21280, doi:10.1038/s41598-021-00518-w.
62. Melzer, M.J.; Sether, D.M.; Karasev, A.V.; Borth, W.; Hu, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 707-714, doi:10.1007/s00705-008-0051-8
63. Sether, D.M.; Melzer, M.J.; Borth, W.B.; Hu, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae members. *Virus Genes* **2009**, *38*, 414-420, doi:10.1007/s11262-009-0334-5.

Supplementary Table 1. Sequence of the primers used in RT-PCR assays for the detection of PMWaVs.

Virus specificity	Forward primer		Reverse primer		Genome region	Amplicon length (bp)	Reference
	primer name	primer sequence	primer name	primer sequence			
PMWaV1	PMW1dF	AGTGAAGTGTGGTGGATCCT	PMWV1dR	TTTGTGTACGACTGTGCGCAAT	RdRp	281	Gambley et al., 2009
PMWaV2	PMWaV2-224	CATACGAACTAGACTCATACTG	PMWaV2-223	CCATCCACCAATTTTACTAC	HSP70h	609	Sether et al., 2005
PMWaV3	Wilt3dF	GAATGGTTTCAAAGTAGGGTTCCA	Wilt3dR	GACGGTATATTTTCGAGTTCAC	RdRp	402	Gambley et al., 2009
PMWaV5	PMWaV5_57F	TCGAGGAGTGGAAAGTTGTG	PMWaV5_348R	AAGAGAGGCTAAGCGGACAA	HSP70h	292	This study
PMWaV6	PMWaV6_568F	GATGTGCTTGTGGCCGTTTT	PMWaV6_809R	ACTTGTGACGGTGTGGT	HSP70h	242	This study
PMWaV7	PMWaV7_830F	CGGCTGAGCTATGACTCTG	PMWaV7_1498R	CGGCTGAGCTATGACTCTG	HSP70h	669	This study

Supplementary Table 2. Identification of the 5' and 3' ends of the genome sequences of PMWaV species using RACE PCR and long read approaches.

Contigs ID	5' end		3' end	
	RACE PCR	long read	RACE PCR	long read
Contig-A	-	yes	-	yes
Contig-B	-	yes	-	no
Contig-C	-	yes	-	no
Contig-D	[5'- CTCGCTTCCATCAATCTCTCAGCCAGT -3']	no	-	no
Contig-E	[5'- CTGCTCGAAACCACGCCAATCTTAACAGG -3']	yes	-	no
Contig-F	[5'- TGGACACAGATGATGAGGAGACGTTGGGAG -3']	yes	[5'- TCCACAGTGCATTGTAGACACCATCGCAGC -3']	yes

- : Not Available.

Supplementary Table 3. Genomic organization of PMWaV sequences described on pineapple in Reunion Island.

Virus species	Number of ORFs	Subgroup	ORF names (encoded proteins / domain names)											
			ORF1a (L-Pro Met Hel)	ORF1b (RdRp)	ORF2 (p3-p6)	ORF3 (p5)	ORF4 (HSP70h)	ORF5 (putative protein)	ORF6 (CP)	ORF7 (CPm)	ORF8 (unknown protein)	ORF9 (unknown protein)	ORF10 (unknown protein)	
PMWaV1	7	II	Length (bp)	6,234	1527	156	-	1,611	1,728	7,774	633	-	-	-
			Molecular weight (kDa)	231.9	53.5	5.5	-	58.5	62.2	28.8	23.8	-	-	-
			Position of ORFs	355-6,588	6,623-8,149	8,133-8,288	-	8,263-9,873	9,755-11,482	11,505-12,278	12,310-12,942	-	-	-
PMWaV2	10	I	Length (bp)	5,850	1,659	-	144	1,626	1,239	909	1,476	516	585	516
			Molecular weight (kDa)	209.1	63.8	-	5.1	59.0	47.6	33.7	51.4	18.6	21.0	5.7
			Position of ORFs	1,017-6,866	6,835-8,493	-	9,132-9,275	9,289-10,914	11,128-12,366	12,442-13,350	13,382-14,857	14,847-15,362	15,359-15,943	15,940-16,092
PMWaV3	7	II	Length (bp)	6,408	1,467	162	-	1,602	1,623	789	633	-	-	-
			Molecular weight (kDa)	231.8	52.7	5.9	-	58.1	59.2	27.8	24.0	-	-	-
			Position of ORFs	215-6,622	6,714-8,180	8,161-8,322	-	8,306-9,907	9,888-11,510	11,609-12,397	12,469-13,101	-	-	-
PMWaV5	7	II	Length (bp)	6,102	1,506	156	-	1,611	1,698	804	645	-	-	-
			Molecular weight (kDa)	226.8	52.3	5.7	-	58.4	61.2	30	24.3	-	-	-
			Position of ORFs	355-6,456	6,485-7,990	8,001-8,156	-	8,131-9,741	9,650-11,347	11,379-12,182	12,208-12,852	-	-	-
PMWaV6	11	I	Length (bp)	5,979	1,674	165	138	1,641	1,467	951	1,497	558	531	597
			Molecular weight (kDa)	218.1	64	5.5	5.1	58.5	55.7	32.9	56.5	21.2	19.9	22.5
			Position of ORFs	744-6,722	6,673-8,346	8,934-9,098	9,427-9,564	9,566-11,206	11,206-12,672	12,764-13,714	13,831-15,327	15,328-15,885	15,991-16,521	16,543-17,139
PMWaV7	10	I	Length (bp)	6,213	1,485	102	132	1,707	1,479	939	1,488	546	696	-
			Molecular weight (kDa)	219	53.8	3.3	4.6	60.2	56.8	34.3	52.8	19.6	26.5	-
			Position of ORFs	1,058-7,270	7,353-8,837	10,149-10,250	10,769-10,900	10,919-12,625	12,586-14,064	14,259-15,197	15,305-16,792	16,851-17,396	17,455-18,150	-

- : ORF not predicted for this sequence.

Supplementary Table 4. List of sequences used for pairwise identity comparisons and phylogenetic analysis.

Accession numbers ¹	Virus names (Acronyms)	Species names	Genus
MH206615	Air potato virus 1 (AiPoV1)	Air potato virus 1	
NC_022072	Blackberry vein banding-associated virus (BVBaV)	<i>Blackberry vein banding-associated virus</i>	
NC_016509	Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV1)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	
NC_029783	Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV13)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 13</i>	
NC_004667	Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV3)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	
NC_016416	Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV4)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i>	
NC_005065	Little cherry virus 2 (LChV2)	<i>Little cherry virus 2</i>	
MH704743	Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 strain 4 (PMWaV1)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 strain 4</i>	
NC_010178	Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV1)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 1</i>	
OQ850037			
NC_043105	Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV2)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 2</i>	<i>Ampelovirus</i>
OQ850038			
NC_043406	Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV3)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 3</i>	
OQ850039			
EF467920			
EF467922	Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV5)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 5</i>	
OQ850040			
MW269512	Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV6)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 6</i>	
OQ850041			
OQ850042	Pineapple mealybug wilt-associated virus 7 (PMWaV7)	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 7</i>	
NC_055482	Pistachio ampelovirus A (PAVA)	<i>Pistachio ampelovirus A</i>	
NC_009992	Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNSPaV)	<i>Plum bark necrosis stem pitting-associated virus</i>	
NC_001598	Beet yellows virus (BYV)	<i>Beet yellows virus</i>	<i>Closterovirus</i>

¹ : Accession numbers in bold: genome sequences of PMWaV species described in this study.

Chapitre 4

Discussion Générale et Perspectives



Culture in vitro de plantules d'ananas du cultivar *Queen Victoria*
(Source Delphine Massé)

La maladie du *mealybug wilt disease of pineapple* (MWD) est l'une des principales contraintes phytosanitaires de la culture de l'ananas dans le monde, notamment à La Réunion. Le premier volet de cette thèse a porté sur la caractérisation des principaux paramètres épidémiologiques associés à la MWD à la Réunion (**Chapitre 2**) et le second sur l'identification du cortège viral potentiellement associé à l'expression de certains symptômes de la maladie (**Chapitre 3**). L'ensemble de nos investigations a permis de préciser le rôle de facteurs biotiques et/ou abiotiques dans l'étiologie de la MWD, de caractériser le virome de l'ananas à la Réunion et de concevoir une approche de diagnostic des virus de l'ananas basée sur le séquençage haut débit. Ce travail contribue à l'élucidation de l'étiologie de la MWD et ouvre la voie à l'étude des routes d'invasion des virus d'ananas par des approches de phylogéographie à l'échelle mondiale, grâce aux approches de métagénomique virale optimisées dans le cadre de cette thèse.

La MWD, une énigme étiologique

Les virus et leur pacte d'alliance

L'implication dans l'étiologie de la MWD de facteurs biotiques, comme les badnavirus et ampelovirus décrits sur ananas et leurs insectes vecteurs, et abiotiques, comme les carences nutritives et le stress hydrique, font l'objet d'hypothèses divergentes. Gambley et Thomas (2015) ont émis l'hypothèse d'une **interaction synergique entre les ampelovirus (PMWaV) et les badnavirus (PBV)**, à l'instar des nombreux cas de synergie virale (*i.e.* interaction positive entre des virus) décrits chez les plantes, qui provoquent dans certains cas des symptômes accrus et jouent un rôle dans la dynamique des populations virales (Wintermantel *et al.*, 2018). C'est par exemple le cas du complexe viral de la maladie du tungro du riz (Hibino, 1983; Koganezawa, 1998), dont les symptômes complets ne s'expriment que lors de co-infections entre le rice tungro bacilliform virus (RTBV, genre *Tungrovirus*, famille *Caulimoviridae*), et le rice tungro spherical virus (RTSV, genre *Waikavirus*, famille *Secoviridae*) (Borah *et al.*, 2013; Kumar and Dasgupta, 2017), ce dernier assurant la transmission vectorielle, par cicadelle, du complexe viral (Cabauatan and Hibino, 1988). C'est également le cas pour le complexe viral de l'enroulement des feuilles de la vigne, également connu sous le

nom de *grapevine leaf roll disease*. Ce complexe viral comprend notamment les grapevine leafroll-associated virus (GLRaV, genre *Ampelovirus*, famille *Closteroviridae*) et les grapevine virus (GV, genre *Vitivirus*, famille *Betaflexiviridae*), qui agissent de manière synergique pour provoquer des symptômes caractéristiques sur les feuilles et les grappes de raisin (Rowhani *et al.*, 2018). Dans le cas de la MWD à La Réunion, notre échantillonnage était majoritairement co-infecté par au moins deux et jusqu'à neuf virus différents. Ces virus, de même que d'autres qui ont été caractérisés sur ananas par différentes équipes pendant cette thèse, comme le PinVA (genre *Vitivirus*, famille *Betaflexiviridae*) et les PSV (genre *Sadwavirus*, famille *Secoviridae*), pourraient également être impliqués dans des co-infections et possiblement dans des associations synergiques.

Mutualisme : le traité plante/virus

De nombreuses études suggèrent que certaines infections virales peuvent induire des mécanismes de défense chez les plantes, les rendant potentiellement plus **résistantes à divers stress**. Certains auteurs parlent de **mutualisme** chez les plantes virosées, faisant référence à une relation bénéfique dans laquelle la plante hôte et le virus tirent avantage de leurs interactions (Hily *et al.*, 2016). Dans ce contexte, le virus peut coloniser la plante et s'y multiplier, tandis que la plante peut bénéficier d'effets positifs résultant de l'infection virale (Xu *et al.*, 2008). On peut citer le grapevine fanleaf virus (GFLV) qui améliore la tolérance de la vigne au stress hydrique (Jež-Krebelj *et al.*, 2022), ou le tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) qui confère une thermotolérance et une résistance à la sécheresse chez la tomate (Shteinberg *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une **corrélation négative** entre le **jaunissement** des feuilles d'ananas, qui est également un symptôme de stress hydrique, et la présence de virus. Cette observation pourrait indiquer que les plantes virosées résistent mieux à la sécheresse. Elle suggère aussi que les symptômes de jaunissement des feuilles, qui sont fréquemment associés à la MWD, sont de **mauvais indicateurs** d'une infection virale.

A la recherche de corrélations entre symptômes de la MWD et présence virale

Plusieurs études ont suggéré une association entre les symptômes de la MWD et la présence du PMWaV2 (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019; Sether and Hu, 2002a, b). Cependant, une association virus-maladie a également été décrite en présence du PMWaV1 (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005) ou du PMWaV3, ou du PMWaV2 et de cochenilles (Sether and Hu, 2002a). Les travaux de Gambley (2008) indiquent également que PMWaV1 et PMWaV3 pourraient être impliqués dans la MWD.

Face à ces données peu concordantes, nous avons recherché l'existence éventuelle de corrélations entre la présence de PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 et PBCOV et des symptômes de rougissement, de jaunissement, d'incurvation, de flétrissement et de dessèchement des feuilles d'ananas, qui sont couramment observés sur des plants virosés (Shurtleff *et al.*, 2023), mais ne sont pas spécifiques d'infections virales (**Chapitre 2**). Nous avons observé une corrélation significative entre les symptômes de dessèchement et de flétrissement et la présence du PMWaV2 ou du PMWaV3. Quant au PMWaV1, sa présence est plutôt associée au flétrissement et à l'incurvation. Bien que nos recherches n'aient pas révélé de corrélation entre la présence du virus et les symptômes de la MWD, elles ont néanmoins mis en évidence que les symptômes tels que l'**incurvation**, le **flétrissement** et le **dessèchement** des feuilles sont les **meilleurs indicateurs**, sans pour autant constituer une preuve de causalité. De plus, notre étude a été limitée par une puissance statistique insuffisante en raison de faibles effectifs ou prévalences pour certaines combinaisons virus/symptômes, ainsi que par des difficultés d'annotation des symptômes lors des enquêtes de terrain. Les résultats de ce travail permettent néanmoins d'envisager un travail d'enquête de plus grande ampleur, qui se concentrerait sur les seuls symptômes d'incurvation, de flétrissement et de dessèchement des feuilles, et prendrait en compte des paramètres environnementaux jusqu'ici négligés, tels que la température, la pluviométrie ou l'ensoleillement. Cependant, notre travail et des études conduites par d'autres équipes (Gambley, 2008; Gambley *et al.*, 2008; Sether and Hu, 2002a) montrent combien **l'étiologie de la MWD est complexe** et combien il est difficile de l'appréhender par des approches expérimentales.

MWD : maladie ou syndrome?

Les études de Calvo (2003) distinguent les maladies virales, caractérisées par une association claire entre un virus et des symptômes spécifiques, des **syndromes**, qui englobent des symptômes variables dont l'étiologie n'est pas clairement définie.

Concernant la MWD, le ou les agent(s) responsable(s) n'est (ne sont) pas encore clairement identifié(s), et les symptômes foliaires associés ne sont pas spécifiques. En effet, l'interaction de la plante avec des facteurs biotiques comme des attaques de ravageurs (nématodes, champignons, ...), ou des facteurs environnementaux (carences en nutriment, accidents climatiques : sécheresse, brûlure, excès d'eau, agressions chimiques (Mrisho *et al.*)), peuvent déclencher des symptômes équivalents. Le rougissement par exemple, décrit comme un des symptômes typiques de la MWD, peut être provoqué ou accentué par divers stress comme les piqûres de cochenilles (Carter, 1963), l'application du TIF (Saltveit, 1999) ou des variations de températures (Awuah and Adzim, 2004; Fitter and Hay, 2001). Des symptômes de flétrissement et de dessèchement sont également rapportés lors de stress hydriques (Carter, 1945; Malézieux *et al.*, 2003; Py *et al.*, 1984), et des symptômes de jaunissement lors de carences minérales (Py *et al.*, 1984) ou d'apports excessifs d'azote. Enfin, des symptômes de dessèchement et de flétrissement sont également provoqués sur ananas par certains ravageurs comme les nématodes (De Freitas Ferreira *et al.*, 2014; Rohrbach and Johnson, 2003) ou les champignons (Carter, 1962; Py *et al.*, 1984). Par ailleurs, ces symptômes foliaires peuvent être transitoires, le développement de nouveaux étages foliaires asymptomatiques amenant à une rémission, fréquemment observée à Hawaï (Carter, 1945, 1963).

L'origine complexe et multifactorielle des symptômes de la MWD, imputables à des facteurs biotiques et abiotiques, suggère que la MWD répond à la définition d'un syndrome plutôt qu'à celle d'une maladie.

Caractérisation du virome de l'ananas par des approches innovantes de métagénomique virale

Diagnostic métagénomique viral : avantages et inconvénients des HTS

Le travail rapporté dans cette thèse a révélé une prévalence importante de co-infections dans les échantillons collectés à La Réunion, avec jusqu'à neuf virus distincts présents dans un même échantillon. Or, la détection d'une telle diversité par des approches classiques avec *a priori*, basées sur la PCR, représente un véritable défi pour un laboratoire de diagnostic, car ces techniques sont chronophages et qu'elles permettraient difficilement de détecter de nouveaux virus émergents. *A contrario*, les approches de séquençage haut débit ont démontré leur efficacité pour **caractériser l'ensemble, voire la quasi-totalité, des virus présents dans un échantillon**, en minimisant les biais et sans avoir d'information préalable sur leurs séquences génomiques. Les HTS permettent notamment : **1)** de donner une vue d'ensemble du virome présent dans un échantillon (Maclot *et al.*, 2020), y compris des souches, des variants distants ou de nouvelles espèces virales (Pecman *et al.*, 2017; Rong *et al.*, 2023) ; **2)** d'éliminer (selon les protocoles) les biais potentiels introduits par les techniques basées sur la PCR et l'usage d'amorces spécifiques (Alberdi *et al.*, 2018) ; **3)** de réduire les coûts de diagnostic par rapport à la multiplication de tests conventionnels, notamment en permettant de traiter simultanément, par multiplexage, un grand nombre d'échantillons (Costa *et al.*, 2022). Parfois, ces approches ont aussi une sensibilité accrue permettant de détecter des infections virales à un stade précoce (Rott *et al.*, 2017; Santala and Valkonen, 2018).

Cependant, les approches de HTS présentent également certaines **limites d'utilisation pour le diagnostic de routine** (Pallás *et al.*, 2018) : **1)** le coût des consommables et de certains équipements spécifiques ainsi que l'accès à un séquenceur ou une plateforme de séquençage peut s'avérer élevé ; **2)** l'analyse des données nécessite la construction de pipelines d'analyses bio-informatiques adaptés et des compétences pour interpréter les résultats, ainsi qu'une logistique de gestion des données brutes (stockage, puissance de calcul) et des mises à jour des outils, **3)** la pollution des données de séquence virale par des séquences génomiques de plante hôte peut rendre difficile la détection spécifique des virus (Kutnjak *et al.*, 2021; Mehetre *et al.*, 2021; Roossinck *et al.*, 2015), **4)** les

contaminations croisées entre échantillons peuvent entraîner des erreurs d'interprétation des résultats (Maree *et al.*, 2018; Rott *et al.*, 2017). Ces limites peuvent être atténuées par une mutualisation des moyens afin de réduire les coûts et de disposer des expertises requises, et/ou par le recours à des contrôles dits 'alien' permettant de détecter les contaminations croisées, ce dernier point étant soulevés à maintes reprises (Gauthier *et al.*, 2022; Rong *et al.*, 2023; Massart *et al.*, 2022).

Evaluation d'approches de séquençage haut débit pour le diagnostic des virus d'ananas

Au début de cette thèse, aucun résultat de séquençage haut débit (HTS) pour caractériser le virome de l'ananas n'était disponible publiquement. Depuis, des avancées majeures ont été effectuées par des équipes brésiliennes (Peron *et al.*, 2019) et hawaïennes (Green *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2021; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022) grâce à la technologie Illumina utilisant des ARN ribodéplétés (rRNAd). C'est sur cette base que nous avons entrepris de tester et d'optimiser différents processus de préparation des matrices et de séquençage. Nous avons évalué sur ananas différentes approches HTS de deuxième (Illumina ; siRNA, dsRNA, VANA) et troisième (Nanopore MinION ; ARN total) génération (**Chapitre 3**). Sur la base des résultats obtenus, nous avons procédé à une analyse comparative approfondie de deux approches, le séquençage Illumina d'ARN ribodéplétés (*short reads*) et le séquençage MiniON de cDNA (*long reads*). L'approche *short reads*, grâce à son très haut débit, a permis d'obtenir une large couverture des génomes viraux, avec une profondeur moyenne et un taux d'erreur plus faible que celui obtenu par l'approche *long reads*. Cependant, cette dernière a permis de caractériser les extrémités 5' et 3' du génome de la majorité des virus présents dans l'échantillon analysé, sans devoir avoir recours aux techniques de RACE PCR. Nos résultats montrent que les **deux approches *short reads* et *long reads* sont complémentaires**, comme l'ont également montré des travaux récents (Fowkes *et al.*, 2023; Linde *et al.*, 2023; Van Borm *et al.*, 2020). D'autres études comparatives suggèrent que l'approche *long reads* (à partir d'ARN total ribodéplété) permet d'assembler des génomes viraux consensus proches de ceux générés à partir des données *short reads*, à condition que suffisamment de données de séquençage soient produites (Pecman *et al.*, 2022). De plus en plus de travaux indiquent que les technologies de

séquençage par *long reads* sont adaptées pour un diagnostic virologique précis et rapide (Sun *et al.*, 2022) et/ou étudier les interactions plantes-pathogènes (Hamim *et al.*, 2022). La diminution du temps de préparation des acides nucléiques avant séquençage, l'amélioration continue de la chimie, de la précision des lectures ainsi que la baisse des coûts et l'autonomie de séquençage, font de la technologie d'Oxford Nanopore Technologies une méthode attrayante pour le diagnostic des virus des plantes (Liefting *et al.*, 2021; Vazquez-Iglesias *et al.*, 2022).

Vers des approches de diagnostic haut débit des virus d'ananas basés sur le HTS

Nos travaux ont permis de montrer le potentiel des approches de HTS pour le diagnostic des virus d'ananas. Ils constituent une base solide pour concevoir des approches de diagnostic, en combinant l'approche *short reads* sur ARN ribodéplété, et le multiplexage d'un grand nombre d'échantillons afin de réduire les coûts d'analyse. Pour cela, il conviendra d'**améliorer l'efficacité de l'étape de ribodéplétion**, qui est actuellement limitante. Celle-ci est souvent basée sur l'hybridation des ARNr avec des amorces complémentaires, pour former des hybrides ARN/ADN, qui sont par la suite hydrolysés spécifiquement, mais elle utilise actuellement des amorces ciblant les ARNr de plantes modèles. Les efforts devront maintenant porter sur la conception d'amorces ciblant spécifiquement les ARNr d'ananas (Phelps *et al.*, 2021), qui permettraient d'accroître l'efficacité l'étape de ribodéplétion et d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic des virus d'ananas par HTS en condition de multiplexage.

Apports et limites du diagnostic virologique par HTS pour l'application de la réglementation des organismes nuisibles

La réglementation fixant les conditions phytosanitaires requises pour l'introduction de végétaux en France et en Europe est en pleine évolution. Le nouveau règlement européen (2016-2031) relatif aux mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux est appliqué depuis décembre 2019. Les DROM, considérés comme des pays tiers, sont exclus de son champ d'application et doivent faire l'objet d'arrêtés spécifiques concernant les organismes nuisibles à y réglementer, qui n'ont toujours pas été publiés. En attendant, La Réunion est soumise à l'arrêté préfectoral N°2016-1920 modifiant celui du 2011-1479 du 30 septembre 2011, dont l'annexe 2 précise que la dissémination de l'organisme nuisible 'Pineapple

mealybug wilt-associated closterovirus', décrit comme présent sur le territoire de l'île de La Réunion, doit être limité sur les 'Végétaux du genre *Ananas* destinées à la plantation à l'exception des semences'. L'annexe 4, concernant les exigences particulières requises pour l'introduction et la circulation des végétaux à La Réunion, précise pour sa part que seuls les ananas issus d'un programme de multiplication *in vitro* (VP) peuvent être introduits sous réserve d'une constatation officielle que les pieds-mères sont **1)** 'certifiés indemnes de pineapple mealybug wilt-associated virus après indexation par une méthode qui sera précisée en déclaration supplémentaire', et **2)** 'placés en quarantaine à l'arrivée chez un producteur enregistré et agréé par le service en charge de la protection des végétaux de La Réunion'. **A ce stade, le législateur n'a pas encore décidé du statut de ces virus**, même s'il est probable qu'ils soient déclarés 'organismes réglementés non de quarantaine (ORNQ)', ce qui impliquerait la mise en place d'un passeport phytosanitaire. L'arrêté ne précise pas quels ampelovirus devront être indexés ni quelle est la situation réglementaire vis-à-vis des badnavirus, et encore moins celle des nouveaux virus décrits récemment (sadwavirus et vitivirus). Le diagnostic virologique basé sur des approches de HTS apparaît particulièrement adapté pour accompagner la mise en place de la réglementation relative à l'introduction et à la circulation des végétaux à La Réunion. Cependant, **la détection de nouveaux virus par des approches de HTS pose un défi en matière de politique et de réglementation phytosanitaires** concernant notamment l'épineuse question du lien de causalité entre virus et maladie, ainsi que la séparation des organismes pathogènes et des organismes commensaux (Adams *et al.*, 2018). En effet, on ne dispose pour la plupart des virus de plantes caractérisés par ces approches d'aucune information sur leur biologie, notamment leur pathogénicité. Cette **absence de données biologiques** empêche une prise de décision raisonnée quant à la classification réglementaire de ces virus et incite souvent à les inclure d'office dans la liste des organismes nuisibles réglementés, avec toutes les implications pratiques qui résultent de cette classification, notamment sur la surveillance et l'assainissement. Afin d'aider dans la prise de décision, Fontdevila Pareta *et al.*, (2023) ont proposé un cadre qui vise à organiser les étapes nécessaires après la découverte d'un nouveau phytovirus par des approches HTS pour évaluer son impact à différents niveaux.

Apports des approches de HTS pour étudier la diffusion et l'évolution des virus d'ananas à l'échelle mondiale

Diversité et dissémination des virus d'ananas à La Réunion

La combinaison des approches *short reads* et *long reads* nous a permis d'assembler dix contigs de génomes viraux appartenant à quatre familles et quatre genres différents. Nous avons ainsi caractérisé deux nouveaux virus (PinVA et PMWaV7) et obtenu la première séquence complète du génome du PMWaV5. Enfin, nous avons décrit pour la première fois la présence de deux virus (PMWaV6 et PSVA) hors de leur lieu de première description, à Hawaï (Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2021). Les analyses phylogénétiques des PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 effectuées dans le cadre de cette thèse (**Article 4**) sur un jeu de données limité montrent une absence de structuration géographique apparente de la diversité de ces virus. Ce résultat suggère des échanges fréquents de virus d'ananas à l'échelle mondiale, et soutient l'hypothèse actuelle selon laquelle ces trois virus ont été principalement disséminés par les activités humaines. L'ensemble des données de la littérature, ainsi que notre étude, soulignent en effet le rôle de la multiplication végétative dans la diffusion mondiale de l'ananas et des virus qui lui sont associés (Dey *et al.*, 2018; Joy and Anjana, 2015; Larrea-Sarmiento *et al.*, 2022; Moreno *et al.*, 2023).

Afin de mieux comprendre **l'histoire de la dissémination de ces virus**, nous avons constitué une **collection mondiale de plus de 2 000 échantillons foliaires** d'ananas, provenant de **19 pays et DROM**. Les avancées méthodologiques résultant de ce travail de thèse permettent désormais d'envisager l'indexation par HTS de ces échantillons, afin **i)** d'affiner notre connaissance de la diversité mondiale du virome de l'ananas, et **ii)** de compléter nos données préliminaires de phylogéographie des virus afin d'en déduire leur histoire évolutive, et de retracer leurs routes d'invasion.

Voyager dans le passé grâce aux ARN anciens

L'utilisation d'échantillons anciens conservés dans des herbiers permet de retracer **l'histoire évolutive et les routes d'invasion** d'agents pathogènes de plantes, dont les virus (Campos *et al.*, 2021; Campos *et al.*, 2023; Rieux *et al.*, 2021). Une première expérimentation basée sur 28 échantillons anciens d'ananas provenant de l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris et de celui

de La Réunion a déjà été réalisée en se basant sur les travaux de Rieux et al. (2022) et la stratégie de séquençage des siRNA (Kreuze *et al.*, 2009). Nos premières investigations, qui ne sont pas rapportées dans cette thèse, n'ont pas permis d'assembler des contigs viraux car très peu de *reads* correspondaient à des séquences virales, conséquence probable d'une importante dégradation des ARN extraits. Cependant, les résultats obtenus suggèrent la présence du PMWaV1 dans un échantillon datant de 1840 provenant d'Amérique et un autre datant de 1934 provenant de Polynésie Française, ainsi que celle de PBCOV dans un échantillon de Guyane datant de 1978. La **poursuite de ces investigations sur les échantillons historiques d'herbier**, grâce à la mise en œuvre des approches de HTS optimisées issues de notre travail, pourrait permettre d'obtenir des informations précieuses sur l'histoire évolutive des virus d'ananas et de mieux comprendre leurs routes de dissémination, en complément de l'analyse des échantillons de la collection mondiale d'échantillons foliaires décrite ci-dessus.

Stratégies de gestion de la MWD pour assurer la durabilité de la filière ananas

A La Réunion, l'état sanitaire des parcelles d'ananas et la gestion de la MWD sont des enjeux majeurs pour les filières de production, dans un contexte de recrudescence de la MWD dans l'ensemble des zones de production dans le monde (Carrasco-Lozano *et al.*, 2023), d'accroissement du nombre de virus décrits sur ananas, et de changement climatique provoquant des périodes de stress hydrique de plus en plus marquées. En effet, malgré la tolérance des plantes aux virus persistants (Roossinck, 2019), notre étude suggère que l'**accumulation des trois ampelovirus** PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 au cours du temps, entraîne une augmentation des symptômes et une **dégradation générale de l'état sanitaire des parcelles d'ananas**, qui pourrait être accentuée par les autres virus décrits sur ananas. De plus, les infections virales mixtes fréquentes, comme le montrent nos résultats, pourraient favoriser l'émergence par recombinaison de nouveaux variants plus virulents et/ou accroître, par synergie, la sévérité des symptômes viraux. Par conséquent, il est essentiel de mettre en œuvre un programme de gestion de la MWD.

Proposer un itinéraire technique adapté à la maîtrise de la MWD

A La Réunion, des **recommandations de bonnes pratiques** de la culture d'ananas ont été proposées dans le cadre du projet ANANABIO (2015-2019) afin de contrôler au mieux la MWD et ses vecteurs potentiels en agriculture biologique (AB) (Soler *et al.*, 2020). Les actions recommandées (**Annexe 2**) comprennent **1)** la sélection de rejets d'apparence saine et leur préparation pour éliminer un maximum de cochenilles, **2)** l'élimination des plants présentant des symptômes dans les parcelles cultivées, **3)** l'utilisation de vitroplants certifiés, **4)** la lutte contre les fourmis, **5)** le suivi d'un programme de fertilisation garantissant un bon état nutritionnel des plantes, **6)** la gestion des adventices, réservoirs potentiels de cochenilles, **7)** l'élimination des résidus de la plantation précédente pour éviter les sources d'infection, **8)** la réalisation d'une rotation des cultures avec des plantes de services, et enfin **9)** la minimisation de la mitoyenneté entre parcelles d'ananas. On peut ajouter à cette liste de préconisations, la lutte chimique contre les cochenilles et les fourmis, dans le cas de parcelles en agriculture conventionnelle (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2017).

Ces bonnes pratiques s'appuient sur **le diagnostic de la MWD**. Des méthodes indirectes de diagnostic basées sur l'imagerie et le *deep learning* (*i.e.* processus d'apprentissage basé sur les réseaux de neurones) pourraient être employées. Ces techniques, directement utilisables au champ, sont plus rapides et moins coûteuses que l'expertise humaine. Elles ont déjà été utilisées avec succès pour la détection et la classification des maladies des plantes (Saleem *et al.*, 2019). Par exemple, un outil développé sur pommier pour la détection et la classification des maladies, des carences nutritionnelles et des dommages causés par les herbicides à partir d'images de feuilles, a permis d'obtenir une précision de 97,3%, contre 96% pour l'expertise humaine (Nachtigall *et al.*, 2016). L'application Nuru (Mrisho *et al.*, 2020), utilisée en Afrique de l'Ouest, permet pour sa part de diagnostiquer les symptômes des maladies virales du manioc avec une plus grande précision (jusqu'à 88%) que celle des agents de vulgarisation agricole (40-58%) ou des agriculteurs (18-31%). Des outils équivalents ne sont pas encore disponibles pour le diagnostic virologique sur ananas, mais ils existent pour d'autres applications pour cette culture, par exemple la sélection au champ des seuls fruits matures et leur cueillette par un bras mécanique, qui permettent de simplifier le processus ultérieur de classement des fruits (Lai *et al.*, 2023). Des systèmes automatisés permettent également de distinguer les cultivars (Ali *et al.*, 2022) ou de détecter,

reconnaître et compter les fruits d'ananas dans les parcelles afin de prévoir le rendement et planifier la vente (Woods *et al.*, 2019).

Les vitroplants : une arme pour lutter contre la MWD ?

Lors de notre enquête réalisée en 2020 (**Chapitre 2**), nous avons observé une prévalence des virus et une incidence des symptômes de la MWD atteignant 100% sur certaines parcelles, et corrélé cette incidence forte à un manque de suivi des recommandations issues du projet ANANABIO, notamment l'utilisation de plants d'ananas certifiés issus de vitroplants (VP). Le suivi de plusieurs parcelles de productions issues de VP, réalisé pendant plusieurs années dans le cadre de cette thèse, a montré qu'aucun des plants de ces parcelles n'a été infecté par le PMWaV2, le PBCOV ou le PBERV, et que le niveau global d'infection par le PMWaV1 et le PMWaV3 était modéré (50% (29/60) après une période de 19 mois) voir faible (25% (85/348) pour les parcelles suivies pendant quatre ans) (**Chapitre 2**), ce qui suggère que **l'utilisation de VP garantis indemnes de virus pourrait permettre un meilleur contrôle des viroses de l'ananas à La Réunion**. *A contrario*, les parcelles de production issues de rejets se sont avérées infectées à 100% lors de la collecte. Les VP sont déjà utilisés avec succès dans de nombreux pays, principalement dans des systèmes de culture industrielle à faible coût de production, au Costa Rica, en Thaïlande, aux Philippines, au Brésil, au Mexique, au Kenya ou à Cuba (Nápoles *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2016).

La sous-utilisation de VP d'ananas à La Réunion est en grande partie imputable à leur coût (3€), qui est 50 fois supérieur à celui des rejets traditionnels (0,06€) (Chambre d'Agriculture de La Réunion, 2023). La micropropagation réalisée en serre *insect-proof* à partir de VP certifiés, après indexation par des méthodes basées sur le HTS, permettrait de proposer un **plant indemne de virus de deuxième génération** à 0,35€, soit 8,5 fois **moins cher qu'un VP** (coût estimé par la Société Horticole de Bassin Plat, St Pierre), et environ 6 fois plus cher qu'un rejet traditionnel. L'écart de prix résiduel par rapport à un rejet traditionnel pourrait être compensé par un meilleur rendement des plants sains par rapport à celui de plants infectés issus de rejets et par une diminution de coûts de traitement phytosanitaire et de fertilisants. Ce **schéma de production** serait accompagné d'un **schéma de certification**, basé sur des procédures déjà existantes (**Annexes 3**), et **optimisé grâce aux nouvelles connaissances du virome** de l'ananas acquises ces dernières années (Peron *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2020;

Larrea-Sarmiento *et al.*, 2020; 2021; 2022; les travaux de cette thèse), incluant des **étapes d'indexage par séquençage HTS**.

En conclusion, nos travaux précurseurs dans le domaine de la métagénomique sur l'ananas, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces méthodes. La détection de nombreux virus principalement à Hawaï et à La Réunion suggère que leur présence est probablement répandue à travers différentes régions du monde, soulignant l'importance d'approfondir les recherches sur le virome de l'ananas à l'échelle mondiale.

Dans l'avenir, il sera essentiel de mener des études complémentaires afin de déterminer la prévalence spécifique de ces virus et d'évaluer leurs rôles respectifs, qu'ils agissent seuls ou en synergie, ainsi que leurs effets dans l'étiologie de la MWD. Cette complexité souligne la nécessité de développer des outils de diagnostic précis pour évaluer la santé des plants d'ananas. La combinaison d'approches de séquençage à haut débit pourrait être envisagée comme un modèle pour l'indexation et le séquençage des virus, compte tenu de la complexité des interactions virales potentielles, afin de surveiller et gérer efficacement l'état sanitaire des cultures d'ananas dans un contexte marqué par des changements globaux.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. V., Avšič-Županc, T., Ballinger, M. J., Bente, D. A., Beer, M., Bergeron, É., Blair, C. D., Briese, T., Buchmeier, M. J., Burt, F. J., Calisher, C. H., Cháng, C., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, J. C. S., de la Torre, J. C., de Lamballerie, X., Dèng, F., Di Serio, F., Digiaro, M., Drebot, M. A., Duàn, X., Ebihara, H., Elbeaino, T., Ergünay, K., Fulhorst, C. F., Garrison, A. R., Gão, G. F., Gonzalez, J.-P. J., Groschup, M. H., Günther, S., Haenni, A.-L., Hall, R. A., Hepojoki, J., Hewson, R., Hú, Z., Hughes, H. R., Jonson, M. G., Junglen, S., Klempa, B., Klingström, J., Kòu, C., Laenen, L., Lambert, A. J., Langevin, S. A., Liu, D., Lukashevich, I. S., Luò, T., Lü, C., Maes, P., de Souza, W. M., Marklewitz, M., Martelli, G. P., Matsuno, K., Mielke-Ehret, N., Minutolo, M., Mirazimi, A., Moming, A., Mühlbach, H.-P., Naidu, R., Navarro, B., Nunes, M. R. T., Palacios, G., Papa, A., Pauvolid-Corrêa, A., Pawęska, J. T., Qiáo, J., Radoshitzky, S. R., Resende, R. O., Romanowski, V., Sall, A. A., Salvato, M. S., Sasaya, T., Shěn, S., Shí, X., Shirako, Y., Simmonds, P., Sironi, M., Song, J.-W., Spengler, J. R., Stenglein, M. D., Sū, Z., Sūn, S., Táng, S., Turina, M., Wáng, B., Wáng, C., Wáng, H., Wáng, J., Wèi, T., Whitfield, A. E., Zerbini, F. M., Zhāng, J., Zhāng, L., Zhāng, Y., Zhang, Y.-Z., Zhāng, Y., et al. (2019). Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of Virology* 164, 1949-1965.
- Adams, I. P., Fox, A., Boonham, N., Massart, S., and De Jonghe, K. (2018). The impact of high throughput sequencing on plant health diagnostics. *European Journal of Plant Pathology* 152, 909-919.
- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., and Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10, 537-45.
- Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus—positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology* 1, 151-157.
- Agranovsky, A. A. (1996). Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: over the barriers. *Advances Virus Research* 47, 119-58.
- Agreste (2010). Surfaces des zones de production d'ananas 'Queen Victoria' à La Réunion.
- Agreste (2021). Les chiffres de l'agriculture réunionnaise. *Agreste : la statistique agricole*.
- Agrios, G. N. (2009). Plant Pathogens and Disease: General Introduction. In "Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)" (M. Schaechter, ed.), pp. 613-646. Academic Press, Oxford.
- Aimone, C. D., Lavington, E., Hoyer, J. S., Deppong, D. O., Mickelson-Young, L., Jacobson, A., Kennedy, G. G., Carbone, I., Hanley-Bowdoin, L., and Duffy, S. (2021). Population diversity of cassava mosaic begomoviruses increases over the course of serial vegetative propagation. *Journal of General Virology* 102.
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., and Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution* 9, 134-147.
- Ali, M. M., Hashim, N., Abd Aziz, S., and Lasekan, O. (2022). Quality prediction of different pineapple (*Ananas comosus*) varieties during storage using infrared thermal imaging technique. *Food Control* 138, 108988.
- Alkan, C., Sajjadian, S., and Eichler, E. E. (2011). Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature methods* 8, 61-65.
- Álvarez, C. E., Carracedo, A., Iglesias, E., and Martínez, M. (1993). Pineapples cultivated by conventional and organic methods in a soil from a banana plantation. A comparative study of soil fertility, plant nutrition and yields. *Biological Agriculture & Horticulture* 9, 161-171.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., and Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in ecology & evolution* 19, 535-544.

- Andrивon, D., Montarry, J., and Fournet, S. (2022). Plant Health in a One Health world: missing links and hidden treasures. *Plant Pathology* 71, 23-29.
- Anses (2015). "Évaluation du risque d'introduction du complexe viral dit du « Wilt » de l'ananas via des vitro-plants d'ananas dans les départements d'outre-mer." Anses.
- Asare-Bediako, E., Nyarko, J., and van der Puije, G. C. (2020). First report of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 infecting pineapple in Ghana. *New Disease Reports* 41.
- Awuah, R. T., and Adzim, E. (2004). Etiological and epidemiological studies on the red leaf disease of pineapple in Ghana. *African Crop Science Journal (ISSN: 1021-9730) Vol 12 Num 2* 12.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., and Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19, 455-77.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., and Gonsalves, D. (1979). The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv Virus Res* 25, 93-168.
- Barba, M., Czosnek, H., and Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses* 6, 106-136.
- Barral, B. (2017). Maladie des taches noires de l'ananas: étude des relations hôte-pathogène et compréhension des mécanismes physiologiques de résistance, Université Montpellier.
- Barral, B., Chillet, M., Doizy, A., Grassi, M., Ragot, L., Léchaudel, M., Durand, N., Rose, L. J., Viljoen, A., and Schorr-Galindo, S. (2020). Diversity and toxigenicity of fungi that cause pineapple fruitlet core rot. *Toxins* 12, 339.
- Bartholomew, D. P., Hawkins, R. A., and Lopez, J. A. (2012). Hawaii Pineapple: The Rise and Fall of an Industry. *HortScience horts* 47, 1390-1398.
- Bartholomew, D. P., Paull, R. E., and Rohrbach, K. G. (2003). "The pineapple: botany, production and uses," Cabi Publishing.
- Beard, J., Ochoa, R., Bauchan, G., Trice, M., Redford, A., Walters, T., and Mitter, C. (2012). Flat mites of the world-Edition 2. *World Wide Web* 1, 1-80.
- Beardsley, J. W. (1959). On the taxonomy of pineapple mealybugs in Hawaii, with a description of a previously unnamed species (Homoptera: Pseudococcidae).
- Bauman, F. (2006). "The Pineapple: king of fruits," Random House.
- Ben-Dov, Y. (1994). "A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance," Intercept Limited.
- Bester, R., van Niekerk, C., and Maree, H. J. (2023). Analyses of fig (*Ficus carica* L.) leaves for virome profiling of mosaic diseased trees from the Western Cape Province (South Africa). *Journal of Plant Pathology*, 1-7.
- Boher, B. (1974). La pourriture du coeur de l'ananas. Etude histologique de l'infection par *Phytophthora palmivora* (Butl.). Pénétration active du parasite dans les organes aériens. *Fruits* 29, 721-726.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30, 2114-2120.
- Boone, M., De Koker, A., and Callewaert, N. (2018). Capturing the 'ome': the expanding molecular toolbox for RNA and DNA library construction. *Nucleic Acids Research* 46, 2701-2721.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., and Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* 186, 20-31.
- Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., and Barker, I. (2002). The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of virological methods* 101, 37-48.
- Borah, B. K., Sharma, S., Kant, R., Johnson, A. M. A., Saigopal, D. V. R., and Dasgupta, I. (2013). Bacilliform DNA-containing plant viruses in the tropics: commonalities within a genetically diverse group. *Molecular Plant Pathology* 14, 759-771.

- Bouhida, M., Lockhart, B., and Olszewski, N. E. (1993). An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. *Journal of General Virology* 74, 15-22.
- Bousalem, M., Douzery, E. J., and Seal, S. (2008). Taxonomy, molecular phylogeny and evolution of plant reverse transcribing viruses (family Caulimoviridae) inferred from full-length genome and reverse transcriptase sequences. *Archives of Virology* 153, 1085-1102.
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., and Huang, X. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature biotechnology* 26, 1146-1153.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F., and Rohwer, F. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14250-5.
- Bua, B., Karungi, J., and Kawube, G. (2013). Occurrence and effects of pineapple mealybug wilt disease in central Uganda. *Journal of Agricultural Science and Technology. A* 3, 410.
- Cabauatan, P., and Hibino, H. (1988). Isolation, purification, and serology of rice tungro bacilliform and rice tungro spherical viruses. *Plant Disease* 72, 526-528.
- Cabi (2021). Phytophthora. 25/04/23.
- Calvo, F., Karras, B. T., Phillips, R., Kimball, A. M., and Wolf, F. (2003). Diagnoses, syndromes, and diseases: a knowledge representation problem. *AMIA Annual Symposium proceedings* 2003, 802.
- Campos, P. E., Groot Crego, C., Boyer, K., Gaudeul, M., Baider, C., Richard, D., Pruvost, O., Roumagnac, P., Szurek, B., Becker, N., Gagnevin, L., and Rieux, A. (2021). First historical genome of a crop bacterial pathogen from herbarium specimen: Insights into citrus canker emergence. *PLOS Pathogens* 17, e1009714.
- Campos, P. E., Pruvost, O., Boyer, K., Chiroleu, F., Cao, T. T., Gaudeul, M., Baider, C., Utteridge, T. M., Becker, N., and Rieux, A. (2023). Herbarium specimen sequencing allows precise dating of *Xanthomonas citri* pv. *citri* diversification history. *Nature Communications* 14, 4306.
- Candresse, T., Filloux, D., Muhire, B., Julian, C., Galzi, S., Fort, G., Bernardo, P., Daugrois, J.-H., Fernandez, E., Martin, D. P., Varsani, A., and Roumagnac, P. (2014). Appearances Can Be Deceptive: Revealing a Hidden Viral Infection with Deep Sequencing in a Plant Quarantine Context. *PLOS ONE* 9, e102945.
- Cano-Reinoso, D., SOESANTO, L., and WIBOWO, C. (2021). Fruit collapse and heart rot disease in pineapple: Pathogen characterization, ultrastructure infections of plant and cell mechanism resistance. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity* 22.
- Carr, M. (2012). The water relations and irrigation requirements of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*): A REVIEW. *Experimental Agriculture* 48.
- Carrasco-Lozano, E. C., Carrillo-Ordóñez, G. A., Gamarra-Gamarra, D., Torres-Suarez, G., Villar, C. M., Stange, C., and Valverde, R. A. (2023). Pineapple mealybug wilt-associated viruses 1, 2, and 3 are associated with mealybug wilt disease of pineapple in Peru. *Journal of Plant Pathology* 105, 581-586.
- Carter, W. (1932). The Pineapple Mealybug (*Pseudococcus brevipes* (CM.)) and Wilt of Pineapples. (Abstract.). *Phytopathology* 20, 996-997 pp.
- Carter, W. (1933). The pineapple mealybug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. *Phytopathology* 23, 207-242.
- Carter, W. (1935). Studies on the biological control of *Pseudococcus brevipes* and wilt of pineapple. *Phytopathology* 28, 1037-1041.
- Carter, W. (1944). Some etiological aspects of mealybug wilt. *Phytopathology* 35, 305-315.
- Carter, W. (1945a). The influence of plant nutrition on susceptibility of pineapple plants to mealybug wilt. *Phytopathology* 35, 316-323.
- Carter, W. (1945b). The oral secretions of the pineapple mealybug. *Journal of Economic Entomology* 38, 335-338.

- Carter, W. (1947). Plantation trials on ant control now feasible with new insecticides. *Special report (Pineapple Research Institute of Hawaii); no. 8.*
- Carter, W. (1962). The systemic phytotoxemias: Mealybug wilt of pineapple. In "Insects in relation to plant disease" (W. Carter, ed.), pp. 238-265. Interscience, New York.
- Carter, W. (1963). Mealybug wilt of pineapple ; a reapraisal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 105, 741-764.
- Carter, W. (1967). "Insects and related pests of pineapple in Hawaii," Pineapple Research Institute of Hawaii.
- Carter, W., and Collins, J. (1947). Resistance to mealybug wilt of pineapple with special reference to a cayenne-queen hybrid. *Phytopathology* 37, 332-348.
- Chambre d'Agriculture de La Réunion (2023). Fiche technico-économique.
- Chan, Y., d'Eeckenbrugge, G. C., and Sanewski, G. M. (2003). Breeding and variety improvement. In "The pineapple: Botany, production and uses", pp. 33-55. CABI Publishing Wallingford UK.
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., and Niknafs, A. (2014). NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. *Journal of Statistical Software* 61, 1-36.
- Chávez-Calvillo, G., Contreras-Paredes, C. A., Mora-Macias, J., Noa-Carrazana, J. C., Serrano-Rubio, A. A., Dinkova, T. D., Carrillo-Tripp, M., and Silva-Rosales, L. (2016). Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology* 489, 179-191.
- CIRAD-IRFA (1987). Inventaire et état des recherches de l'IRFA sur ananas (septembre 1986) : Complexe sol-racines : les ravageurs. *Fruits* 42, 669-677.
- Collins, J. L. (1960). The pineapple. *The pineapple.*
- Commins, J., Toft, C., and Fares, M. A. (2009). Computational biology methods and their application to the comparative genomics of endocellular symbiotic bacteria of insects. *Biological procedures online* 11, 52-78.
- Compendium, C. (2021). *Ceratocystis paradoxa*. 25/04/23.
- Cooke, T., Persley, D., and House, S. (2009). "Diseases of fruit crops in Australia," Csiro publishing.
- Costa, L. C., Atha, B., Hu, X., Lamour, K., Yang, Y., O'Connell, M., McFarland, C., Foster, J. A., and Hurtado-Gonzales, O. P. (2022). High-throughput detection of a large set of viruses and viroids of pome and stone fruit trees by multiplex PCR-based amplicon sequencing. *Frontiers in Plant Science* 13.
- d'Eeckenbrugge, G. C., and Leal, F. (2003). Morphology, anatomy and taxonomy. In "The pineapple: botany, production and uses", pp. 13-32. CABI Publishing Wallingford UK.
- d'Eeckenbrugge, G. C., Segura, S. D., Jaramillo, E. H., and Gongora, G. A. (1997). L'ananas. In "L'Amélioration des Plantes Tropicales, CIRAD-ORSTOM.", pp. 37-60. Collection Repères.
- d'Eeckenbrugge, G. C., Sanewski, G. M., Smith, M. K., Duval, M.-F., and Leal, F. (2011). Ananas. In "Wild crop relatives: genomic and breeding resources: tropical and subtropical fruits", pp. 21-41. Springer.
- DAAF-Réunion (2021). Bilan d'activité 2021 de la DAAF de La Réunion.
- Daniells, J. W., Geering, A. D. W., Bryde, N. J., and Thomas, J. E. (2001). The effect of Banana streak virus on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. *Annals of Applied Biology* 139, 51-60.
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 34, 2666-2669.
- de Fátima Ruas, C., Ruas, P. M., and Cabral, J. R. S. (2001). Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers. *Euphytica* 119, 245-252.
- De Freitas Ferreira, T., Moreira Souza, R., Silva Idalino, W. S., Dos Santos Ferreira, K. D., and Torres Brioso, P. S. (2014). Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Helicotylenchus* sp. with mealybug wilt of pineapple in microplots. *Nematropica* 44, 181-189.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology* 72, 2207-2216.

- De Souza, W. C. O., Nascimento, L. C., Dos Santos, T. S., De Vidal, J., and Da Silva, H. F. (2015). Behavior in vitro of *chalara paradoxa*, causal agent of pineapple black rot in different growth conditions. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37, 845-851.
- Delwart, E. L. (2007). Viral metagenomics. *Reviews in medical virology* 17, 115-131.
- Dewald, M. G., Moore, G. A., Sherman, W. B., and Evans, M. H. (1988). Production of pineapple plants in vitro. *Plant Cell Reports* 7, 535-537.
- Dey, K. K., Borth, W. B., Melzer, M. J., Wang, M.-L., and Hu, J. S. (2015). Analysis of Pineapple Mealybug Wilt Associated Virus -1 and -2 for Potential RNA Silencing Suppressors and Pathogenicity Factors. *Viruses* 7, 969-995.
- Dey, K. K., Green, J. C., Melzer, M., Borth, W., and Hu, J. S. (2018). Mealybug Wilt of Pineapple and Associated Viruses. *Horticulturae* 4, 52.
- Dey, K. K., Lin, H., Borth, W. B., Melzer, M. J., and Hu, J. S. (2012). A highly sensitive single-tube nested PCR assay for the detection of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 (PMWaV-2). *Journal of Virological Methods* 183, 215-218.
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T., and Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic acids research* 36, e105.
- Dorey, E. (2014). Modélisation de l'élaboration du rendement et de la qualité de l'"ananas" Queen Victoria"-Application à la conception de systèmes de culture durables à la Réunion, UM2.
- Dortet, L., Bonnin, R., and Naas, T. (2017). Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Feuillets de biologie* 354.
- Duval, M.-F., Buso, G. S., Ferreira, F., Noyer, J.-L., d'Eeckenbrugge, G. C., Hamon, P., and Ferreira, M. (2003). Relationships in Ananas and other related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Genome* 46, 990-1004.
- Duval, M.-F., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Ferreira, F., Bianchetti, L., and Cabral, J. R. S. (1995). First results from joint EMBRAPA-CIRAD Ananas germplasm collecting in Brazil and French Guyana. In "II International Pineapple Symposium 425", pp. 137-144.
- Duval, M.-F., Noyer, J.-L., Perrier, X., d'Eeckenbrugge, C., and Hamon, P. (2001). Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 83-90.
- E-Phy (2023). Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture autorisés en France. 28/06/2023.
- Edwards, R. A., and Rohwer, F. (2005). Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 504-510.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., and Bettman, B. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323, 133-138.
- ephytia IDENTIFIÉRIER / CONNÂÎTRE / MAÎTRISER / Tropifruit. 28/05/23.
- Espindola, A. S., Sempertegui-Bayas, D., Bravo-Padilla, D. F., Freire-Zapata, V., Ochoa-Corona, F., and Cardwell, K. F. (2021). TASPÉRT: Target-Specific Reverse Transcript Pools to Improve HTS Plant Virus Diagnostics. *Viruses* 13, 1223.
- FAO-Statista (2023). Volume de la production de fruits dans le monde en 2021. 05/03/23.
- Fellers, J. P., Webb, C., Fellers, M. C., Shoup Rupp, J., and De Wolf, E. (2019). Wheat virus identification within infected tissue using nanopore sequencing technology. *Plant disease* 103, 2199-2203.
- Fitter, A., and Hay, R. (2001). "Environmental Physiology of Plants," 3rd/Ed.
- Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, M. E. C., de Kochko, A., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (2000). Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81, 287-297.
- Fontdevila Pareta, N., Khalili, M., Maachi, A., Rivarez, M. P. S., Rollin, J., Salavert, F., Temple, C., Aranda, M. A., Boonham, N., Botermans, M., Candresse, T., Fox, A., Hernando, Y., Kutnjak, D., Marais, A., Petter, F., Ravnika, M., Selmi, I., Tahzima, R., Trontin, C., Wetzell, T., and Massart, S. (2023). Managing the deluge of newly discovered plant viruses and viroids: an optimized scientific and regulatory framework for their characterization and risk analysis. *Frontiers in Microbiology* 14.
- Fournier, P. (1995). Ananas Victoria. La filière Victoria à la Réunion.
- Fournier, P. (2012). La culture de l'ananas victoria à la réunion pour l'exportation. Recueil de bonnes pratiques.

- Fournier, P., Benneveau, A., Hardy, C., Chillet, M., and Léchaudel, M. (2015). A predictive model based on a pluviothermic index for leathery pocket and fruitlet core rot of pineapple cv. 'Queen'. *European Journal of Plant Pathology* 142, 449-460.
- Fournier, P., Soler, A., and Marie, D. (2011). La culture de l'ananas Victoria à la Réunion pour l'exportation. *Recueil de bonnes pratiques. CIRAD, France*.
- Fowkes, A., Duffy, S., McGreig, S., Vazquez, I., Alraiss, K., Barrett, B., Conyers, C., Webster, G., Ward, R., and Chisnall, K. (2023). Comparison of sequencing methods for obtaining a whole genome of pea necrotic yellow dwarf virus from UK peas. *PhytoFrontiers*.
- Fraille, A., and García-Arenal, F. (2016). Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 17, 50-56.
- FruiTrop (2020). Dossier Ananas 2020. *Rapport annuel du service de la statistique et de la prospective*.
- Fuchs, M., Bar-Joseph, M., Candresse, T., Maree, H. J., Martelli, G. P., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Sabanadzovic, S., and Report Consortium, I. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae. *J Gen Virol* 101, 364-365.
- Fuchs, M., Hily, J.-M., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Thompson, J. R., van der Vlugt, R., Wetzel, T., and Consortium, I. R. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae 2022. *Journal of General Virology* 103.
- Fujiwara, K., and Ikeshiro, T. (2017). Detection of Pineapple mealybug wilt-associated virus 1, 2, 3 by LAMP methods. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan*, 33-38.
- Gallet, R., Fabre, F., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2017). The Number of Target Molecules of the Amplification Step Limits Accuracy and Sensitivity in Ultradeep-Sequencing Viral Population Studies. *Journal of Virology* 91.
- Gambley, C., and Thomas, J. (2015). Mealybug wilt disease. In "Virus diseases of tropical and subtropical crops", pp. 228-236. Cabi Wallingford UK.
- Gambley, C. F. (2008). Aetiology of pineapple mealybug wilt disease in Australia, The University of Queensland.
- Gambley, C. F., Geering, A. D. W., Steele, V., and Thomas, J. E. (2008a). Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new badnavirus species. *Archives of Virology* 153, 1599-1604.
- Gambley, C. F., Steele, V., Geering, A. D. W., and Thomas, J. E. (2008b). The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. *Australasian Plant Pathology* 37, 95-105.
- Garcia, M. L. (1988). Etude taxinomique du genre *Ananas*. Utilisation de la variabilité enzymatique, USTL.
- García Morales, M., Denno, B. D., Miller, D. R., Miller, G. L., Ben-Dov, Y., and Hardy, N. B. (2016). ScaleNet: a literature-based model of scale insect biology and systematics. *Database* 2016, bav118.
- Gasura, E., Mashingaidze, A., and Mukasa, S. (2008). Genetic variability for tuber yield, quality, and virus disease complex traits in Uganda sweetpotato germplasm. *African Crop Science Journal* 16.
- Gasura, E., and Mukasa, S. (2010). Prevalence and implications of sweetpotato recovery from sweet potato virus disease in Uganda. *African Crop Science Journal* 18.
- Geering, A. D., and Thomas, J. E. (2002). Banana streak virus. *AAB Descriptions of Plant Viruses*.
- Geering, A. D. W. (2021). Badnaviruses (Caulimoviridae). In "Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)" (D. H. Bamford and M. Zuckerman, eds.), pp. 158-168. Academic Press, Oxford.
- Geering, A. D. W., McMichael, L. A., Dietzgen, R. G., and Thomas, J. E. (2000). Genetic diversity among banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90, 921-927.
- Geering, A. D. W., Olszewski, N. E., Harper, G., Lockhart, B. E. L., Hull, R., and Thomas, J. E. (2005). Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. *Journal of General Virology* 86, 511-520.
- German, T. L., Ullman, D. E., and Gunashinghe, U. B. (1992). Mealybug Wilt of Pineapple. In "Advances in Disease Vector Research" (K. F. Harris, ed.), pp. 241-259. Springer, New York.

- Global Invasive Species Database (2023). Species profile: Pheidole megacephala. 18/04/23.
- González-Hernández, H., Johnson, M. W., and Reimer, N. J. (1999). Impact of Pheidole megacephala (F.) (Hymenoptera: Formicidae) on the Biological Control of Dysmicoccus brevipes (Cockerell) (Homoptera: Pseudococcidae). *Biological Control* 15, 145-152.
- González, R., Butković, A., Escaray, F. J., Martínez-Latorre, J., Melero, Í., Pérez-Parets, E., Gómez-Cadenas, A., Carrasco, P., and Elena, S. F. (2021). Plant virus evolution under strong drought conditions results in a transition from parasitism to mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2020990118.
- Goodwin, S., Wappel, R., and McCombie, W. R. (2017). 1D Genome Sequencing on the Oxford Nanopore MinION. *Current Protocols in Human Genetics* 94, 18.11.1-18.11.14.
- Gotzek, D., Axen, H. J., Suarez, A. V., Helms Cahan, S., and Shoemaker, D. (2015). Global invasion history of the tropical fire ant: a stowaway on the first global trade routes. *Mol Ecol* 24, 374-88.
- Green, J., and Nelson, S. (2015). Heart and root rots of pineapple. *Plant Disease* 106, 1-7.
- Green, J. C., Rwahni, M. A., Olmedo-Velarde, A., Melzer, M. J., Hamim, I., Borth, W. B., Brower, T. M., Wall, M., and Hu, J. S. (2020). Further genomic characterization of pineapple mealybug wilt-associated viruses using high-throughput sequencing. *Tropical Plant Pathology* 45, 64-72.
- Groupe de travail collaboratif (2015). "Émergence de la maladie du wilt." Cirad, 'ARMEFLHOR, Chambre d'Agriculture, FDGDON, DAAF.
- Gunasinghe, U., and German, T. (1986). Association of virus-particles with mealybug-wilt of pineapple. In "Phytopathology", Vol. 76, pp. 1073-1073.
- Gunasinghe, U., and German, T. (1987). Further characterization of virus associated with mealybug-wilt of pineapple. In "Phytopathology", Vol. 77, pp. 1776-1776.
- Gunasinghe, U., and German, T. (1989). Purification and partial characterization of a virus from pineapple. *Phytopathology* 79, 1337-1341.
- Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., Moore, N. E., Ren, X., Huang, Q. S., and Carter, P. E. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of Virological Methods* 195, 194-204.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hamim, I., Suzuki, J. Y., Borth, W. B., Melzer, M. J., Wall, M. M., and Hu, J. S. (2022). Preserving plant samples from remote locations for detection of RNA and DNA viruses. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., and Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5, R245-9.
- Hazman, M., Kabil, F., Abd Elhamid, S., and Nick, P. (2020). Double lysis: an integrative time-saving method yielding high-quality RNA from strawberry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18, 22.
- Hernández-Rodríguez, L. (2017). Caracterización del complejo viral asociado a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba.
- Hernández-Rodríguez, L., Nápoles, L., Pérez-Vicente, L. F., Laffitte, O., Ruiz, M., Llanes-Alvarez, Y., and Zamora-Rodríguez, V. (2017). Infección de Pineapple mealybug wilt-associated virus 1, 2 y 3 en plantas de piña, híbrido 'MD-2' en Ciego de Ávila. *Revista Centro Agrícola* 44, 52-60.
- Hernandez-Rodriguez, L., Ramos-Gonzalez, P., Garcia-Garcia, G., Higginson, E. J., and Zamora-Rodriguez, V. (2013). First report of Pineapple bacilliform comosus virus (PBCoV) and endogenous Pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1) in pineapple plants in Cuba. *New Disease Reports* 28, 2044-0588.2013.
- Hernández-Rodríguez, L., Ramos-González, P., García, G., Zamora-Rodríguez, V., Peña, I., Perez, J., and Ferriol, X. (2013). Distribution of mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) disease in commercial fields in Cuba. *CitriFrut* 30, 43-54.

- Hernández-Rodríguez, L., Ramos-González, P., Sistachs-Vega, V., Zamora-Rodríguez, V., Batista-LeRiverend, L., Ramos-Leal, M., Peña, I., and Llanes-Alvarez, Y. (2019). The viral complex associated with mealybug wilt disease of pineapple in Cuba. *Acta horticulturae* 1239, 203-212.
- Hernandez-Rodriguez, L., Ramos-Gonzalez, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peralta-Martin, A. M., Peña, I., Perez, J. M., and Ferriol, X. (2014). Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba. *Crop Protection* 65, 43-50.
- Hibino, H. (1983). Relations of rice tungro bacilliform and rice tungro spherical viruses with their vector *Nephotettix virescens*. *Japanese Journal of Phytopathology* 49, 545-553.
- Hilaire, J., Tindale, S., Jones, G., Pingarron-Cardenas, G., Bačnik, K., Ojo, M., and Frewer, L. J. (2022). Risk perception associated with an emerging agri-food risk in Europe: plant viruses in agriculture. *Agriculture & Food Security* 11, 21.
- Hily, J. M., Poulicard, N., Mora, M., Pagán, I., and García-Arenal, F. (2016). Environment and host genotype determine the outcome of a plant-virus interaction: from antagonism to mutualism. *New Phytologist* 209, 812-22.
- Hohn, T., and Rothnie, H. (2013). Plant pararetroviruses: replication and expression. *Current Opinion in Virology* 3, 621-628.
- Houndédji, C., Zandjanakou-Tachin, M., Affokpon, A., and Bokonon-Ganta, A. (2016). Prevalence de la maladie du déperissement de l'ananas (Wilt) et perception des producteurs au Bénin. *European Scientific Journal November*.
- Hu, J., Gonsalves, A., Sether, D., and Ullman, D. (1992). Detection of pineapple closterovirus, a possible cause of mealybug wilt of pineapple. In "International Pineapple Symposium 334", pp. 411-416.
- Hu, J., Sether, D., Liu, X., Wang, M., Zee, F., and Ullman, D. (1997). Use of a Tissue Blotting Immunoassay to Examine the Distribution of Pineapple Closterovirus in Hawaii. *Plant Disease* 81, 1150-1154.
- Hu, J. S., Sether, D. M., Metzger, M. J., Pérez, E., Gonsalves, A., Karasev, A. V., and Nagai, C. (2005). Pineapple mealybug wilt associated virus and mealybug wilt of pineapple. In "Acta Horticulturae" (A. Rebolledo Martinez, ed.), Vol. 666, pp. 209-212.
- Hu, J. S., Sether, D. M., and Ullman, D. H. (1996). Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* 45, 829-836.
- Hughes, W. O., Howse, P. E., Vilela, E. F., Knapp, J. J., and Goulson, D. (2002). Field evaluation of potential of alarm pheromone compounds to enhance baits for control of grass-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 95, 537-543.
- Husson, F., Josse, J., and Lê, S. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25.
- Illingworth, J. F. (1931). Preliminary report on evidence that mealy bugs are an important factor in pineapple wilt. *Journal of Economic Entomology* 24, 877-889.
- Ito, K. (1938). Studies on the Life History of the Pineapple Mealybug, *Pseudococcus brevipes* (Ckll.). *Journal of Economic Entomology* 31, 291-298 pp.
- Ito, K. (1959). Terminal mottle as a symptomatological aspect of mealybug wilt with evidence supporting the hypothesis of a virus etiology of the disease. *Research report (Pineapple Research Institute of Hawaii); no. 62*.
- Ito, K. (1962). Additional immunological evidence supporting the virus nature of mealybug wilt. *Pineapple Res. Inst. News* 10, 158-162.
- Jahn, G. (1993). Gray pineapple mealybugs, *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley (Homoptera: Pseudococcidae), inside closed pineapple blossom cups.
- Jahn, G. C. (1992). "The ecological significance of the big-headed ant in mealybug wilt disease of pineapple," University of Hawai'i at Manoa.
- Jahn, G. C., and Beardsley, J. W. (2000). Interactions of ants (Hymenoptera: Formicidae) and mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae) on pineapple. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 36, 9-28.

- Jahn, G. C., Beardsley, J. W., and González-Hernández, H. (2003). A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple.
- Jeon, M.-S., Jeong, D., Huijeong, D., Kang, H. A., Jung, H., and Eyun, S.-I. (2023). A practical comparison of the next-generation sequencing platform and assemblers using yeast genome. *Life Science Alliance* 6, e202201744.
- Jež-Krebelj, A., Rupnik-Cigoj, M., Stele, M., Chersicola, M., Pompe-Novak, M., and Sivilotti, P. (2022). The physiological impact of GFLV virus infection on grapevine water status: first observations. *Plants* 11, 161.
- Johansen, E., Edwards, M., and Hampton, R. (2003). Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Annual Review of Phytopathology* 32, 363-386.
- Jones, R. A. C. (2021). Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. *Plants* 10, 233.
- Jones, R. A. C., and Naidu, R. A. (2019). Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Annual Review of Virology* 6, 387-409.
- Jouvenaz, D., Lofgren, C., and Banks, W. (1981). Biological control of imported fire ants: A review of current knowledge. *Bulletin of the ESA* 27, 203-209.
- Joy, P., and Anjana, R. (2015). Evolution of pineapple. *Pineapple Research Station*.
- Joy, P. P., and Sindhu, G. (2012). "DISEASES OF PINEAPPLE (*Ananas comosus*): Pathogen, symptoms, infection, spread & management."
- Karasev, A. V. (2000). Genetic Diversity and Evolution of Closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38, 293-324.
- Karyeija, R., Kreuze, J., Gibson, R., and Valkonen, J. (2000). Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 269, 26-36.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30, 3059-66.
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772-80.
- Keetch, D. (1977). Yellow spot in pineapple *Pineapple series* H5.
- Keetch, D., and Buckley, N. H. (1984). A check—list of the plant—parasitic nematodes of southern Africa.
- Ko, H. L., Campbell, P. R., Jobin-Décor, M. P., Eccleston, K. L., Graham, M. W., and Smith, M. K. (2006). The Introduction of Transgenes to Control Blackheart in Pineapple (*Ananas Comosus* L.) cv. Smooth Cayenne by Microprojectile Bombardment. *Euphytica* 150, 387-395.
- Koffi, Y. F., Alloue-Boraud, W. A. M., Ban Koffi, L., and Dje, K. M. (2017). L'ananas (*Ananas Comosus* (L) M): Altérations et moyens de lutte -A Review. *International Journal of Innovation Sciences and Research* 6, 976-981.
- Koganezawa, H. (1998). Present status of controlling rice tungro virus. *Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, RK Khetarpal, and H. Koganezawa, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 459-469.*
- Koonin, E., and Dolja, V. (2018). Metaviromics: a tectonic shift in understanding virus evolution. *Virus Research* 246, A1-A3.
- Krauss, B. H. (1948). Anatomy of the Vegetative Organs of the Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr Merr. I. Introduction, Organography, the Stem, and the Lateral Branch or Axillary Buds. *Botanical Gazette* 110, 159-217.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., and Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388, 1-7.
- Krishnamurthy, S. R., and Wang, D. (2017). Origins and challenges of viral dark matter. *Virus research* 239, 136-142.
- Kularatne, R. P. D., Dassanayake, E., and Attanayaka, T. (2017). Investigation of Host Range of Pineapple Mealy Bug Wilt Associated Pineapple Bacilliform Virus (PBV) by Polymerase Chain Reaction (PCR) Within the Bromeliaceae Family. In "7th Agricultural Research Symposium (AGRES)", Wayamba University of Sri Lanka.

- Kumar, G., and Dasgupta, I. (2017). Molecular Biology of Rice Tungro Viruses and Strategies for Their Control. *Biotic Stress Management in Rice*, 1.
- Kutnjak, D., Tamisier, L., Adams, I., Boonham, N., Candresse, T., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Kreuze, J. F., Lefebvre, M., Silva, G., Malapi-Wight, M., Margaria, P., Mavrič Pleško, I., McGreig, S., Miozzi, L., Remenant, B., Reynard, J.-S., Rollin, J., Rott, M., Schumpp, O., Massart, S., and Haegeman, A. (2021a). A Primer on the Analysis of High-Throughput Sequencing Data for Detection of Plant Viruses. *Microorganisms* 9, 841.
- Kutnjak, D., Tamisier, L., Adams, I., Boonham, N., Candresse, T., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Kreuze, J. F., Lefebvre, M., Silva, G., Malapi-Wight, M., Margaria, P., Mavrič Pleško, I., McGreig, S., Miozzi, L., Remenant, B., Reynard, J. S., Rollin, J., Rott, M., Schumpp, O., Massart, S., and Haegeman, A. (2021b). A Primer on the Analysis of High-Throughput Sequencing Data for Detection of Plant Viruses. *Microorganisms* 9.
- Lai, Y., Ma, R., Chen, Y., Wan, T., Jiao, R., and He, H. (2023). A pineapple target detection method in a field environment based on improved YOLOv7. *Applied Sciences* 13, 2691.
- Lamberti, F., Vovlas, N., Roca, F., Chinappen, M., la Massese, C. S., Aubert, B., and Quilici, S. (1986). A survey of plant parasitic nematodes from the island of Reunion, Indian Ocean. *Frustula Entomologica* 9, 165-185.
- Larrea-Sarmiento, A., Geering, A. D. W., Olmedo-Velarde, A., Wang, X., Borth, W., Matsumoto, T. K., Suzuki, J. Y., Wall, M. M., Melzer, M., Moyle, R., Sharman, M., Hu, J., and Thomas, J. E. (2022a). Genome sequence of pineapple secovirus B, a second sadwavirus reported infecting *Ananas comosus*. *Archives of Virology* 167, 2801-2804.
- Larrea-Sarmiento, A., Olmedo-Velarde, A., Green, J. C., Al Rwahnih, M., Wang, X., Li, Y. H., Wu, W., Zhang, J., Matsumoto, T. K., Suzuki, J. Y., Wall, M. M., Borth, W., Melzer, M. J., and Hu, J. S. (2020). Identification and complete genomic sequence of a novel sadwavirus discovered in pineapple (*Ananas comosus*). *Archives of Virology* 165, 1245-1248.
- Larrea-Sarmiento, A., Olmedo-Velarde, A., Wang, X., Borth, W., Matsumoto, T. K., Suzuki, J. Y., Wall, M. M., Melzer, M., and Hu, J. (2021). A novel ampelovirus associated with mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus*). *Virus Genes* 57, 464-468.
- Larrea-Sarmiento, A. E., Olmedo-Velarde, A., Wang, X., Borth, W., Domingo, R., Matsumoto, T. K., Suzuki, J. Y., Wall, M. M., Melzer, M. J., and Hu, J. (2022b). Genetic Diversity of Viral Populations Associated with *Ananas* Germplasm and Improvement of Virus Diagnostic Protocols. *Pathogens* 11.
- Larsen, L. D. (1910). Diseases of pineapple. Hawaii Sugar Planters Association Pathol. Physiol. Ser. *Experimental Station Bulletin* 10, 1-72.
- Lasken, R. S., and Stockwell, T. B. (2007). Mechanism of chimera formation during the Multiple Displacement Amplification reaction. *BMC biotechnology* 7, 1-11.
- Le Provost, G., Iskra-Caruana, M. L., Acina, I., and Teycheney, P. Y. (2006). Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. *J Virol Methods* 137, 7-13.
- Leal, F. (1990). On the validity of *Ananas monstrosus*. *Journal of the Bromeliad Society (USA)*.
- Leal, F., d'Eeckenbrugge, G. C., and Holst, B. K. (1998). Taxonomy of the genera *Ananas* and *Pseudananas*—an historical review. *Selbyana*, 227-235.
- Lee, H.-J., Cho, I.-S., and Jeong, R.-D. (2022). Nanopore Metagenomics Sequencing for Rapid Diagnosis and Characterization of Lily Viruses. *Plant Pathology Journal* 38, 503-512.
- Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Marcus, S., McCombie, W. R., and Schatz, M. (2014). Error correction and assembly complexity of single molecule sequencing reads. *BioRxiv*, 006395.
- Lee, R. F. (2015). Control of virus diseases of citrus. *Advances in virus research* 91, 143-173.
- Lewcock, H. (1937). The use of acetylene to induce flowering in pineapple plants. *Queensland Agricultural Journal* 48, 532-543.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 34, 3094-3100.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60.

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Subgroup, G. P. D. P. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- Li, J., Wang, J.-c., Ding, T.-b., and Chu, D. (2021). Synergistic Effects of a Tomato chlorosis virus and Tomato yellow leaf curl virus Mixed Infection on Host Tomato Plants and the Whitefly Vector. *Frontiers in Plant Science* 12, 672400.
- Liefting, L. W., Waite, D. W., and Thompson, J. R. (2021). Application of Oxford Nanopore technology to plant virus detection. *Viruses* 13, 1424.
- Linde, J., Brangsch, H., Hölzer, M., Thomas, C., Elschner, M. C., Melzer, F., and Tomaso, H. (2023). Comparison of Illumina and Oxford Nanopore Technology for genome analysis of *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, and *Brucella suis*. *BMC genomics* 24, 1-15.
- Linford, M. (1943). Influence of plant populations upon incidence of pineapple yellow spot. *Phytopathology* 33, 408-410.
- Linford, M. B. (1932). Transmission of the pineapple yellow-spot virus by *Thrips tabaci*. *Phytopathology* 22, 301-324.
- Lobo, G., and Yahia, E. (2017). Biology and postharvest physiology of pineapple. pp. 39-61.
- Lockhart, B., and Olszewski, N. (1996). Schefflera ringspot virus, a widely distributed mealybug-transmitted badnavirus occurring in Schefflera and Aralia. In "IX International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 432", pp. 196-203.
- Loison-Cabot, C. (1992). Origin, phylogeny and evolution of pineapple species. *Fruits* 47, 25-32.
- Lopez-Gomollon, S., and Baulcombe, D. C. (2022). Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23, 645-662.
- Ma, Y., Marais, A., Lefebvre, M., Faure, C., and Candresse, T. (2020). Metagenomic analysis of virome cross-talk between cultivated *Solanum lycopersicum* and wild *Solanum nigrum*. *Virology* 540, 38-44.
- Maclot, F., Candresse, T., Filloux, D., Malmstrom, C. M., Roumagnac, P., van der Vlugt, R., and Massart, S. (2020). Illuminating an Ecological Blackbox: Using High Throughput Sequencing to Characterize the Plant Virome Across Scales. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Maclot, F., Candresse, T., T., Filloux, D., Rott, P., Malmstrom, C., van Der Vlugt, R., Massart, S., and Roumagnac, P. (2021). From boots on the ground to nucleotides in the sequencer: a century of advances in the study of the plant virus ecology - De la paire de bottes à la paire de bases : de l'intérêt d'étudier l'écologie des viromes de plantes. *Virologie* 25, 29-42.
- Maclot, F., Debue, V., Malmstrom, C. M., Filloux, D., Roumagnac, P., Eck, M., Tamisier, L., Blouin, A. G., Candresse, T., and Massart, S. (2023). Long-Term Anthropogenic Management and Associated Loss of Plant Diversity Deeply Impact Virome Richness and Composition of *Poaceae* Communities. *Microbiology Spectrum* 11, e04850-22.
- Magi, A., Semeraro, R., Mingrino, A., Giusti, B., and D'aurizio, R. (2018). Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics* 19, 1256-1272.
- Mahady, A., Harrington, T., and McNew, D. (2002). Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia* 94, 62-72.
- Malézieux, E., Côte, F., and Bartholomew, P. (2003). Crop environment, plant growth and physiology. Chapter 5. In *The Pineapple, Botany, Production and Uses*.
- Marais, A., Faure, C., Bergey, B., and Candresse, T. (2018). Viral Double-Stranded RNAs (dsRNAs) from Plants: Alternative Nucleic Acid Substrates for High-Throughput Sequencing. *Methods in Molecular Biology* 1746, 45-53.
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N., and Candresse, T. (2018). Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Margaria, P., Bosco, L., Vallino, M., Ciuffo, M., Mautino, G. C., Tavella, L., and Turina, M. (2014). The NSs Protein of Tomato spotted wilt virus Is Required for Persistent Infection and Transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology* 88, 5788-5802.

- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C., and Yoshikawa, N. (2002). The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology* 147, 2039-2044.
- Martelli, G. P., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Agranovsky, A., Rwahnih, M. A., Dolja, V. V., Doivas, C. I., Fuchs, M. F., Gugerli, P., Hu, J. S., Jelkmann, W., Katis, N. I., Maliogka, V. I., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M. E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., and Saldarelli, P. (2012). Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 94, 7-19.
- Masoudi-Nejad, A., Tonomura, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Suzuki, M., Itoh, M., Kanehisa, M., Endo, T., and Goto, S. (2006). EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34, W459-62.
- Massart, S., Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G. J., Blouin, A. G., Boonham, N., Candresse, T., Chandellier, A., and De Jonghe, K. (2022). Guidelines for the reliable use of high throughput sequencing technologies to detect plant pathogens and pests. *Peer Community Journal* 2.
- Massart, S., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Glover, R., Haegeman, A., Koloniuk, I., Komínek, P., Kreuze, J., Kutnjak, D., Lotos, L., Maclot, F., Maliogka, V., Maree, H. J., Olivier, T., Olmos, A., Pooggin, M. M., Reynard, J. S., Ruiz-García, A. B., Safarova, D., Schneeberger, P. H. H., Sela, N., Turco, S., Vainio, E. J., Varallyay, E., Verdin, E., Westenberg, M., Brostaux, Y., and Candresse, T. (2019). Virus Detection by High-Throughput Sequencing of Small RNAs: Large-Scale Performance Testing of Sequence Analysis Strategies. *Phytopathology* 109, 488-497.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., and Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research* 188, 90-96.
- Massé, D., Candresse, T., Filloux, D., Massart, S., Cassam, N., Hostachy, B., Marais-Colombel, A., Fernandez, E., Roumagnac, P., Verdin, E., Teycheney, P. Y., Lett, J. M., and Lefeuvre, P. (2023). Characterization of six ampeloviruses infecting pineapple in Reunion Island using a combination of high-throughput sequencing approaches. *En préparation*
- Massé, D., Cassam, N., Hostachy, B., Iskra-Caruana, M.-L., Darnaudery, M., Lefeuvre, P., and Lett, J.-M. (2021). First Report of Three Pineapple Mealybug Wilt-Associated Viruses in Queen Victoria Pineapples in Reunion Island. *Plant Disease* 0, PDIS-05-20-1068-PDN.
- Massé, D., Filloux, D., Candresse, T., Massart, S., Marais, A., Verdin, E., Cassam, N., Fernandez, E., Roumagnac, P., Teycheney, P. Y., Lefeuvre, P., and Lett, J. M. (2022). Identification of a novel vitivirus from pineapple in Reunion Island. *Archives of Virology* 167, 2355-2357.
- McKenzie, H. L. (1967). "Mealybugs of California," Univ of California Press.
- Mehetre, G. T., Leo, V. V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, M. K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A. N., Dawoud, T. M., Almaary, K. S., and Singh, B. P. (2021). Current Developments and Challenges in Plant Viral Diagnostics: A Systematic Review. *Viruses* 13, 412.
- Mekdoud, R., and Jeuffrault, E. (1999). "Inventaire des organismes nuisibles aux cultures à la Réunion." Direction de l'agriculture et de la forêt de la Réunion, Service de la Protection des Végétaux.
- Melzer, M. J., Karasev, A. V., Sether, D. M., and Hu, J. S. (2001). Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *Journal of General Virology* 82, 1-7.
- Melzer, M. J., Sether, D. M., Karasev, A. V., Borth, W., and Hu, J. S. (2008). Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. *Archives of Virology* 153, 707-714.
- Merrill, E. D. (1917). "An interpretation of Rumphius's Herbarium amboinense," Bureau of printing.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31-46.

- Moreno, A. B., and López-Moya, J. J. (2020). When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. *Phytopathology*® 110, 29-48.
- Moreno, I., Rodríguez-Arévalo, K. A., Tarazona-Velásquez, R., and Kondo, T. (2023). Occurrence and distribution of pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs) in MD2 pineapple fields in the Valle del Cauca Department, Colombia. *Tropical Plant Pathology* 48, 217-225.
- Mortimer-Jones, S. M., Jones, M. G., Jones, R. A., Thomson, G., and Dwyer, G. I. (2009). A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *Journal of Virological Methods* 161, 289-296.
- Moubset, O., François, S., Maclot, F., Palanga, E., Julian, C., Claude, L., Fernandez, E., Rott, P., Daugrois, J.-H., Antoine-Lorquin, A., Bernardo, P., Blouin, A. G., Temple, C., Kraberger, S., Fontenele, R. S., Harkins, G. W., Ma, Y., Marais, A., Candresse, T., Chéhida, S. B., Lefeuvre, P., Lett, J.-M., Varsani, A., Massart, S., Ogliastro, M., Martin, D. P., Filloux, D., and Roumagnac, P. (2022). Virion-Associated Nucleic Acid-Based Metagenomics: A Decade of Advances in Molecular Characterization of Plant Viruses. *Phytopathology*® 112, 2253-2272.
- Mrisho, L. M., Mbilinyi, N. A., Ndalaha, M., Ramcharan, A. M., Kehs, A. K., McCloskey, P. C., Murithi, H., Hughes, D. P., and Legg, J. P. (2020). Accuracy of a Smartphone-Based Object Detection Model, PlantVillage Nuru, in Identifying the Foliar Symptoms of the Viral Diseases of Cassava—CMD and CBSD. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Nabi, S. U., Baranwal, V. K., Rao, G. P., Mansoor, S., Vladulescu, C., Raja, W. H., Jan, B. L., and Alansi, S. (2022). High-throughput RNA sequencing of mosaic infected and non-infected apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars: from detection to the reconstruction of whole genome of viruses and viroid. *Plants* 11, 675.
- Nachtigall, L. G., Araujo, R. M., and Nachtigall, G. R. (2016). Classification of apple tree disorders using convolutional neural networks. In "2016 IEEE 28th International Conference on Tools with Artificial Intelligence (ICTAI)", pp. 472-476. IEEE.
- Nápoles, L., Cid, M., Hernández Rodríguez, L., Alvares, Y., Zamora, V., Lorente González, G. Y., Rodríguez, R., and Laffitte, O. (2019). Scale up of in vitro plant production of 'MD2' pineapple free of Pineapple mealybug wilt-associated virus -1, -2 and -3 for introduction to productive scale in Cuba. *Acta Horticulturae* 1239, 121-128.
- New, F. N., and Brito, I. L. (2020). What Is Metagenomics Teaching Us, and What Is Missed? *Annual Review of Microbiology* 74, 117-135.
- Nieves, N., Gaskin, R., Borroto, E., Gonzalez, J., Blanco, M. d., Gonzales, A., and Quiñones, J. (1996). El wilt de la piña: Cambios metabólicos inducidos en Cayena Lisa. *Revista Brasileira de Fruticultura* 18, 245-254.
- Nurbel, T., Soler, A., Thuriès, L., Dorey, E., Chabanne, A., Tisserand, G., Hoarau, L., and Darnaudery, M. (2021). ANANABIO - Concevoir des systèmes de production d'ananas en agriculture biologique. *Innovations Agronomiques* 82, 1-24.
- Olmedo-Velarde, A., Loristo, J., Kong, A., Waisen, P., Wang, K.-H., Hu, J., and Melzer, M. (2022). Examination of the Virome of Taro Plants Affected by a Lethal Disease, the Alomae-Bobone Virus Complex, in Papua New Guinea. *Viruses* 14, 1410.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., and Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In "Advances in Microbial Ecology" (K. C. Marshall, ed.), pp. 1-55. Springer US, Boston, MA.
- Pagán, I., Montes, N., Milgroom, M. G., and García-Arenal, F. (2014). Vertical Transmission Selects for Reduced Virulence in a Plant Virus and for Increased Resistance in the Host. *PLOS Pathogens* 10, e1004293.
- Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., and James, D. (2018). Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiology* 9, 2087.
- Pappu, H., Jones, R., and Jain, R. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141, 219-236.
- Paull, R. E., and Duarte, O. (2011). "Tropical Fruits Volume I. Crop Production Science, Horticulture," CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Pecman, A., Adams, I., Gutiérrez-Aguirre, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnikar, M., and Kutnjak, D. (2022). Systematic Comparison of Nanopore and Illumina Sequencing for the Detection of Plant Viruses and Viroids Using Total RNA Sequencing Approach. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutierrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., and Ravnikar, M. (2017). Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front Microbiol* 8, 1998.
- Perez, E., Sether, D., Melzer, M., Busto, J., Nagai, C., and Hu, J. (2005). Characterization and control of pineapple mealybug wilt associated ampeloviruses. In "V International Pineapple Symposium 702", pp. 23-27.
- Perez, E. P., Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J. L., Hu, J. S., and Nagai, C. (2006). Characterization and control of pineapple mealybug wilt associated Ampeloviruses. In "Acta Horticulturae" (P. H. Joubert, ed.), Vol. 702, pp. 23-27.
- Peron, F. N., Calloni, R., Ventura, J. A., and Fernandes, P. M. B. (2019). Bioinformatics approach to the study of the molecular behaviour of mealybug wilt of pineapple. *Acta horticulturae v.*, pp. 177-184-2019 v. no.1239.
- Petty, G. (1978). "The pineapple mealybug," Department of Agricultural Technical Services.
- Phelps, W. A., Carlson, A. E., and Lee, M. T. (2021). Optimized design of antisense oligomers for targeted rRNA depletion. *Nucleic Acids Research* 49, e5.
- Phillips, J. S. (1934). The biology and distribution of ants in Hawaiian pineapple fields. *The Biology and Distribution of Ants in Hawaiian Pineapple Fields*.
- PineProj (2005). Australia University. 08/02/23.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangaré, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S., and Fauquet, C. M. (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82, 655-665.
- Ploetz, R. C. (1994). "Compendium of Tropical Fruit Diseases," APS Press.
- Prasad, A., Sett, S., and Prasad, M. (2022). Plant-virus-abiotic stress interactions: A complex interplay. *Environmental and Experimental Botany* 199, 104869.
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1641-50.
- Py, C., and Guyot, A. (1970). La floraison contrôlée de l'ananas par l'Ethrel, nouveau régulateur de croissance.(1ère partie). *Fruits* 25, 253-262.
- Py, C., Lacoëuilhe, J.-J., and Teisson, C. (1984). L'ananas : sa culture, ses produits.
- Py, C., Lacoëuilhe, J. J., and Teisson, C. (1987). "Ananas," Editions Quae.
- Redinbaugh, M. G., and Stewart, L. R. (2018). Maize lethal necrosis: an emerging, synergistic viral disease. *Annual Review of Virology* 5, 301-322.
- Reinhardt, D. H. R. C., Bartholomew, D. P., Souza, F. V. D., Carvalho, A. C. P. P. d., Pádua, T. R. P. d., Junghans, D. T., and Matos, A. P. d. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura* 40.
- Rieux, A., Campos, P., Duvermy, A., Scussel, S., Martin, D., Gaudeul, M., Lefevre, P., Becker, N., and Lett, J.-M. (2021). Contribution of historical herbarium small RNAs to the reconstruction of a cassava mosaic geminivirus evolutionary history. *Scientific Reports* 11, 21280.
- Rodríguez, R., Becquer, R., Legrat, Y., López Hernández, D., Escriba, R. C., Lorente González, G. Y., Izquierdo, R., and Gonzalez Olmedo, J. (2016). "Fruits production of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2 from vitroplants."
- Rohrbach, K., and Schmitt, D. (2003). Diseases of pineapple. *Diseases of tropical fruit crops*, 443-464.
- Rohrbach, K. G. (2003). PINK DISEASE.
- Rohrbach, K. G., Beardsley, J. W., German, T. L., Reimer, N. J., and Sanford, W. G. (1988). Mealybug wilt, mealybugs, and ants of pineapple. *Plant Disease* 72, 558-565.
- Rohrbach, K. G., and Johnson, M. W. (2003). Pests, diseases and weeds. In "The pineapple: botany, production and uses", pp. 203-251. CABI publishing Wallingford UK.

- Rohrbach, K. G., Leal, F., and d'Eeckenbrugge, G. C. (2003). History, distribution and world production. In "The pineapple: botany, production and uses", pp. 1-12. CABI Publishing Wallingford UK.
- Rong, W., Rollin, J., Hanafi, M., Roux, N., and Massart, S. (2023). Validation of High-Throughput Sequencing as Virus Indexing Test for Musa Germplasm: Performance Criteria Evaluation and Contamination Monitoring Using an Alien Control. *PhytoFrontiers™* 3, 91-102.
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 9, 99-108.
- Roossinck, M. J. (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* 479-480, 271-277.
- Roossinck, M. J. (2019). Viruses in the phytobiome. *Current Opinion in Virology* 37, 72-76.
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., and Roumagnac, P. (2015). Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology* 105, 716-727.
- Roossinck, M. J., SAHA, P., WILEY, G. B., QUAN, J., WHITE, J. D., LAI, H., CHAVARRÍA, F., SHEN, G., and ROE, B. A. (2010). Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology* 19, 81-88.
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., Lawrence, T., Birch, C., and Bhagwat, B. (2017). Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Disease* 101, 1489-1499.
- Roux, S., Hallam, S. J., Woyke, T., and Sullivan, M. B. (2015). Viral dark matter and virus–host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *elife* 4, e08490.
- Rowhani, A., Daubert, S., Arnold, K., Al Rwahnih, M., Klaassen, V., Golino, D., and Uyemoto, J. (2018). Synergy between grapevine vitiviruses and grapevine leafroll viruses. *European Journal of Plant Pathology* 151, 919-925.
- Saleem, M. H., Potgieter, J., and Arif, K. M. (2019). Plant disease detection and classification by deep learning. *Plants* 8, 468.
- Sanewski, G. M., Bartholomew, D. P., and Paull, R. E. (2018). "The Pineapple, 2nd Edition: Botany, Production and Uses," CABI.
- Sanfaçon, H., Dasgupta, I., Fuchs, M., Karasev, A. V., Petrzik, K., Thompson, J. R., Tzanetakis, I., van der Vlugt, R., Wetzel, T., and Yoshikawa, N. (2020). Proposed revision of the family Secoviridae taxonomy to create three subgenera, "Satsumavirus", "Stramovirus" and "Cholivirus", in the genus Sadwavirus. *Archives of Virology* 165, 527-533.
- Santa-Cecília, L., Prado, E., and Souza, B. (2016). Probing behavior of *Dysmicoccus brevipes* mealybug in pineapple plants. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 46, 458-463.
- Santala, J., and Valkonen, J. P. (2018). Sensitivity of small RNA-based detection of plant viruses. *Frontiers in microbiology* 9, 939.
- Santos, E. M. d. S. M., Figueredo de Oliveira Costa, J., Machado de Medeiros Ferro, M., Silva, S. J. C. d., Assunção, I. P., and Lima, G. S. d. A. (2020). Detection of Badnavirus in pineapple in northeastern Brazil. *Diversitas Journal* 5, 2450-2463.
- Sastry, K. S. (2013). Plant Virus Transmission Through Vegetative Propagules (Asexual Reproduction). In "Seed-borne plant virus diseases", pp. 285-305. Springer India, India.
- Scholz, M. B., Lo, C.-C., and Chain, P. S. (2012). Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. *Current opinion in biotechnology* 23, 9-15.
- Schöneegger, D., Marais, A., Babalola, B., Faure, C., Lefebvre, M., Svanella-Dumas, L., Brázdová, S., and Candresse, T. (2023). Carrot populations in France and Spain host a complex virome rich in previously uncharacterized viruses. *PLoS one* 18, e0290108.
- Sepúlveda, M., Cardona, D., García, Y. G., Higuera, M., Gutiérrez, P. A., and Marín, M. (2022). Virome analysis for identification of viruses associated with asymptomatic infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Colombia. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 97, 187-200.

- Sether, D. M., Borth, W. B., Melzer, M. J., and Hu, J. (2010). Spatial and Temporal Incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in Pineapple Planting Blocks. *Plant Disease* 94, 196-200.
- Sether, D. M., and Hu, J. S. (2001). The impact of Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 and reduced irrigation on pineapple yield. *Australasian Plant Pathology* 30, 31-36.
- Sether, D. M., and Hu, J. S. (2002a). Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92, 928-935.
- Sether, D. M., and Hu, J. S. (2002b). Yield Impact and Spread of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 and Mealybug Wilt of Pineapple in Hawaii. *Plant Disease* 86, 867-874.
- Sether, D. M., Karasev, A. V., Okumura, C., Arakawa, C., Zee, F., Kislán, M. M., Busto, J. L., and Hu, J. S. (2001). Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85, 856-864.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Borth, W. B., and Hu, J. S. (2009). Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae members. *Virus Genes* 38, 414-420.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Borth, W. B., and Hu, J. S. (2012). Pineapple bacilliform CO virus: Diversity, Detection, Distribution, and Transmission. *Plant Disease* 96, 1798-1804.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J., Zee, F., and Hu, J. S. (2005a). Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease* 89, 450-456.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Subere, C. V., and Hu, J. S. (2005b). Pineapple mealybug wilt associated viruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus Ampelovirus. In "Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies ; International Congress of Virology".
- Sether, D. M., MJ. Subere, CV. and Hu, JS. (2005). Pineapple mealybug wilt associated viruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus Ampelovirus. In "Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies ; International Congress of Virology".
- Sether, D. M., Ullman, D. E., and Hu, J. S. (1998). Transmission of Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus by Two Species of Mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88, 1224-1230.
- Shivashakarappa, K., Reddy, V., Tupakula, V. K., Farnian, A., Vuppula, A., and Gunnaiah, R. (2022). Nanotechnology for the detection of plant pathogens. *Plant Nano Biology*, 100018.
- Shteinberg, M., Mishra, R., Anfoka, G., Altaleb, M., Brotman, Y., Moshelion, M., Gorovits, R., and Czosnek, H. (2021). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) promotes plant tolerance to drought. *Cells* 10, 2875.
- Shurtleff, M. C., Pelczar, M. J., Pelczar, R. M., and Kelman, A. (2023). Plant disease. In "Encyclopedia Britannica". 18/03/2023.
- Sidharthan, V. K., Rajeswari, V., and Baranwal, V. K. (2022). Analysis of public domain plant transcriptomes expands the phylogenetic diversity of the family Secoviridae. *Virus Genes* 58, 598-604.
- Simmonds, P., Adams, M. J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M. Q., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., Sabanadzovic, S., Sullivan, M. B., Suttle, C. A., Tesh, R. B., van der Vlugt, R. A., Varsani, A., and Zerbini, F. M. (2017). Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 15, 161-168.
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., and Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*.
- Singh, S. J., and Sastry, K. S. M. (1974). Wilt of pineapple - a new virus disease in India. *Indian Phytopathology* 27, 298-303.
- Sinha, R., Stanley, G., Gulati, G. S., Ezran, C., Travaglini, K. J., Wei, E., Chan, C. K., Nabhan, A. N., Su, T., and Morganti, R. M. (2017). Index switching causes "spreading-of-signal" among multiplexed samples in Illumina HiSeq 4000 DNA sequencing. *BioRxiv*, 125724.

- Sipes, B. S., Sether, D. M., and Hu, J. S. (2002). Interactions between *Rotylenchus reniformis* and Pineapple mealybug wilt associated virus-1 in pineapple. *Plant Disease* 86, 933-938.
- Smith, L., and Downs, R. (1979). Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. Vol. 14. Hafner Press, New York.
- Soler, A., Nurbel, T., Masson, J., Hoarau, I., Tisserand, G., Thuries, L., Chabanne, A., Dorey, E., and Chillet, M. (2020). "Livret technique ANANABIO : Innovations techniques pour la culture de l'ananas en agriculture biologique à la Réunion."
- Soulezelle, J., Algoet, P.-E., and Huat, J. (2019). Le traitement d'induction florale, une alternative pour étaler et planifier les récoltes d'ananas. In "Séminaire de clôture de la phase 1 des projets du RITA Mayotte (2015-2017)" (J. Huat, ed.), pp. 56-66. CIRAD, Brandrélé, Mayotte.
- Stobbe, A. H., and Roossinck, M. J. (2014). Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Subere, C. V. Q., Sether, D. M., Borth, W. B., Melzer, M. J., and Hu, J. S. (2011a). Detection and absolute quantification of pineapple mealybug wilt-associated virus-2 in pineapple using real-time RT-PCR (TaqMan®) assays. In "Acta Horticulturae" (H. Abdullah, M. N. Latifah and D. P. Bartholomew, eds.), Vol. 902, pp. 349-356.
- Subere, C. V. Q., Sether, D. M., Borth, W. B., Melzer, M. J., and Hu, J. S. (2011b). Transmission characteristics of pineapple mealybug wilt associated virus-2 by the grey pineapple mealybugs *Dysmicoccus neobrevipes* in Hawaii. In "Acta Horticulturae" (H. Abdullah, M. N. Latifah and D. P. Bartholomew, eds.), Vol. 902, pp. 393-400.
- Sun, K., Liu, Y., Zhou, X., Yin, C., Zhang, P., Yang, Q., Mao, L., Shentu, X., and Yu, X. (2022). Nanopore sequencing technology and its application in plant virus diagnostics. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology* 13, 204-216.
- Temple, C., Blouin, A. G., Tindale, S., Steyer, S., Marechal, K., and Massart, S. (2023). High Throughput Sequencing technologies complemented by grower's perception highlight the impact of tomato virome in diversified vegetable farms. *bioRxiv*, 2023.01.12.523758.
- Thompson, J. R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A. V., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Tzanetakis, I., van der Vlugt, R., Wetzel, T., Yoshikawa, N., and Ictv Report, C. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae. *Journal of General Virology* 98, 529-531.
- Thompson, M. K., Kiourlappou, M., and Davis, I. (2020). Ribo-Pop: simple, cost-effective, and widely applicable ribosomal RNA depletion. *Rna* 26, 1731-1742.
- Thomson, K. G., Dietzgen, R. G., Thomas, J. E., and Teakle, D. S. (1996). Detection of pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* 129, 57-69.
- Ullman, D., German, T., Gunashinge, U., and Ebesu, R. (1989). Serology of a closterovirus like particle associated with mealybug wilt of pineapple. *Phytopathology* 79, 1341-1345.
- Umber, M., Filloux, D., Gélabale, S., Gomez, R.-M., Marais, A., Gallet, S., Gamiette, F., Pavis, C., and Teycheney, P.-Y. (2020). Molecular Viral Diagnosis and Sanitation of Yam Genetic Resources: Implications for Safe Yam Germplasm Exchange. *Viruses* 12, 1101.
- Valentino, H., Damayanti, T., Nurulita, S., Kurniawati, F., Sartiami, D., Harahap, I., Mubin, N., Basuki, M., and Aziz, R. (2023). Detection and identification of viruses associated to mealybug wilt pineapple in Blitar, East Java, Indonesia. In "IOP Conference Series: Earth and Environmental Science", Vol. 1208, pp. 012013. IOP Publishing.
- Van Borm, S., Fu, Q., Winand, R., Vanneste, K., Hakhverdyan, M., Höper, D., and Vandebussche, F. (2020). Evaluation of a commercial exogenous internal process control for diagnostic RNA virus metagenomics from different animal clinical samples. *Journal of Virological Methods* 283, 113916.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., and Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics* 30, 418-426.

- Vargas-Mejía, P., Vega-Arreguín, J., Chávez-Calvillo, G., Ibarra-Laclette, E., and Silva-Rosales, L. (2020). Differential Accumulation of Innate- and Adaptive-Immune-Response-Derived Transcripts during Antagonism between Papaya Ringspot Virus and Papaya Mosaic Virus. *Viruses* 12, 230.
- Vassilieff, H., Geering, A. D. W., Choisine, N., Teycheney, P.-Y., and Maumus, F. (2023). Endogenous Caulimovirids: Fossils, Zombies, and Living in Plant Genomes. *Biomolecules* 13, 1069.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J., Jacques, M. A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., and Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4.
- Vazquez-Iglesias, I., McGreig, S., Pufal, H., Robinson, R., Clover, G. R., Fox, A., Boonham, N., and Adams, I. P. (2022). A novel high-throughput sequencing approach reveals the presence of a new virus infecting Rosa: rosa ilarvirus-1 (RIV-1). *Journal of Virological Methods* 300, 114417.
- Verdin, E., Wipf-Scheibel, C., Gognalons, P., Aller, F., Jacquemond, M., and 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 Research* 241, 19-28.
- Villamor, D. E. V., Ho, T., Al Rwahnih, M., Martin, R. R., and Tzanetakis, I. E. (2019). High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *Phytopathology*® 109, 716-725.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *TRENDS in Genetics* 17, 449-459.
- Wakman, W. (1994). Two clostero-like viruses and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia, The University of Queensland, St Lucia, Australia.
- Wakman, W., Teakle, D., Thomas, J., and Dietzgen, R. (1995). Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 46, 947-958.
- Westgate, P. J. (1945). Mealybug wilt of pineapples in south Florida. In "Proc. Florida State Hort. Soc", Vol. 58, pp. 194-196.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics* 3, e000132.
- Wintermantel, D., Locke, B., Andersson, G. K. S., Semberg, E., Forsgren, E., Osterman, J., Rahbek Pedersen, T., Bommarco, R., Smith, H. G., Rundlöf, M., and de Miranda, J. R. (2018). Field-level clothianidin exposure affects bumblebees but generally not their pathogens. *Nature Communications* 9, 5446.
- Woods, N. C., Abuh, E. O., and Robert, A. (2019). Development of a pineapple fruit recognition and counting system using digital farm image. *African Journal Computational*, 131-139.
- Xiao, H., Kim, W. S., and Meng, B. (2015). A highly effective and versatile technology for the isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. *Virology Journal* 12, 171.
- Xie, Q., and Guo, H.-S. (2006). Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Research* 118, 1-6.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J. P., Feldman, T., Sumner, L. W., and Roossinck, M. J. (2008). Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* 180, 911-921.
- Yapo, E. S., Kouakou, T. H., Kone, M., Kouadio, J. Y., Kouame, P., and Merillon, J.-M. (2011). Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20, 196-204.
- Zakaria, L. (2023). Fusarium Species Associated with Diseases of Major Tropical Fruit Crops. *Horticulturae* 9, 322.
- Zanella, C. M., Janke, A., Palma-Silva, C., Kaltchuk-Santos, E., Pinheiro, F. G., Paggi, G. M., Soares, L. E. S., Goetze, M., Büttow, M. V., and Bered, F. (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35.
- Zhang, J., Dey, K. K., Lin, B., Borth, W. B., Melzer, M. J., Sether, D., Wang, Y., Wang, I. C., Shen, H., Pu, X., Sun, D., and Hu, J. S. (2017). Characterization of Canna yellow mottle virus in a New Host, *Alpinia purpurata*, in Hawaii. *Phytopathology* 107, 791-799.

- Zhang, P., Jiang, D., Wang, Y., Yao, X., Luo, Y., and Yang, Z. (2021). Comparison of De Novo Assembly Strategies for Bacterial Genomes. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7668.
- Zheng, Y., Gao, S., Padmanabhan, C., Li, R., Galvez, M., Gutierrez, D., Fuentes, S., Ling, K.-S., Kreuze, J., and Fei, Z. (2017). VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology* 500, 130-138.
- zinfos974.com (2015). Un virus ravage la production d'ananas péi. 17/05/23.

Annexes

Annexe 1

Primer sequences used for PCR and RT-PCR assays for the detection of pineapple viruses.

Virus species	Foward primer	Reverse primer	Protein domain	Amplicon length (bp)	Reference
PMWaV-1	PMW1dF [5'- AGTGAAGTGTGGTGGATCCT -3']	PMWV1dR [5'- TTTGTGTACGACTGTGCGCAAT -3']	RdRp	281	Gambley et al., 2009
PMWaV-2	PMWaV2-224 [5'- CATACGAAGTACTCATACG -3']	PMWaV2-223 [5'- CCATCCACCAATTTACTAC -3']	HSP70h	609	Sether et al., 2005
PMWaV-3	Wilt3dF [5'- GAATGGTTTCAAAGTAGGGTTCCA -3']	Wilt3dR [5'- GACGGTATATTCGAGTTCCAC -3']	RdRp	402	Gambley et al., 2009
PMWaV-5	PMWaV5_57F [5'- TCGAGGAGTGAAGGTTGTG -3']	PMWaV5_348R [5'- AAGAGAGGCTAAGGCGACAA -3']	HSP70h	292	This study
PMWaV-6	PMWaV6_568F [5'- GATGTGCTTGTGGCCGTTTT -3']	PMWaV6_809R [5'-ACTTGTGACGGGTTGTTGGT -3']	HSP70h	242	This study
PMWaV-7	PMWaV7_830F [5'- CGGCCTGAGCTATGACTCTG -3']	PMWaV7_1498R [5'-CGGCCTGAGCTATGACTCTG -3']	HSP70h	669	This study
PinVA	PinVA_78F [5'- AACCAAAGAGACCCACGCG -3']	PinVA_298R [5'- ATCCATCGCCTCTGTGCA -3']	CP	221	This study
PSVA-RNA1	PSVA_RNA1_1708F [5'- TGCCTGGGATGGGAAAATCC -3']	PSVA_RNA1_2079R [5'- CCATAAATGTCGGGCGCTG -3']	Polyprotein	372	This study
PSVA-RNA2	PSVA_RNA2_1387F [5'- CCTCCTTCCAGATGGGGA -3']	PSVA_RNA2_1830R [5'- CTCGCCGTGACATAGACTCC -3']	Polyprotein	444	This study
PBCOV	PBV2dF [5'- GAGGCACAGAAGACTTTATTGCTG -3']	PBV2dR [5'- TGCAAATTCCTCCCATCTTCCAT -3']	RT/Rnase H	513	Gambley et al., 2008

Annexe 2

Schéma des innovations sur l'itinéraire technique pour la culture de l'ananas en Agriculture Biologique à La Réunion (ANANABIO, 2019).

- 1) A la plantation :
 - Prélever des rejets sur des parcelles saines. En cas d'absence de parcelles dites saines, opter pour des rejets ne présentant pas les symptômes visuels de la maladie du MWP et, sans cochenilles.
 - Préparation des rejets: parer les rejets et les laisser 'sécher au soleil' racines en l'air pendant plusieurs jours pour que les cochenilles quittent le rejet.
- 2) Mise en place de pépinières :
 - Dans le but de produire du matériel végétal 'sain', indemne de cochenilles, mise en place de pépinières à distance des parcelles de production.
- 3) Durant la période de croissance :
 - Durant les 2-3 premiers mois qui suivent la plantation, réaliser des passages réguliers (tous les 15 jours environ) dans la parcelle pour observer les jeunes plants : si observation d'un plant présentant les symptômes de la maladie, l'arracher, brûler et replanter un rejet sain.
 - Mise en place d'appâts fourmis aux abords de la parcelle.
 - Apports en fertilisation foliaire réguliers permettant une meilleure tolérance des plants aux différents bioagresseurs.
 - Gestion des adventices comme *Bidens pilosa*, *Paspalum sp* ou *Cyperus sp* qui sont des réservoirs à cochenilles et à fourmis.
- 4) Après la récolte :
 - Destruction (si possible avec des broyeurs modifiés qui réduisent les plants et les tiges en éléments extrêmement fins) et enfouissement des résidus de cultures.
 - Rotation avec des plantes de services assainissantes (crotalaires), la monoculture augmentant le potentiel d'infestation.

Annexe 3

Schéma de micropropagation de plants d'ananas indemnes de pathogènes destinés aux producteurs d'ananas de Martinique et mis en œuvre par la filiale Vitropic du Cirad, décrit dans le rapport sur l'évaluation du risque d'introduction du complexe viral dit du « Wilt » de l'ananas via des vitro-plants d'ananas dans les départements d'outre-mer (Anses, 2015).

Le plant initial destiné à être multiplié est indexé selon une batterie d'analyses réalisées sur des feuilles et destinées à s'assurer de l'absence des virus suivants : PMWaV1 et 2, PBCOV, PBERV et TSWV. Cette indexation est réalisée quelle que soit l'origine géographique du plant, même s'il s'agit de la Martinique. Si le plant est sain après indexation, le processus de micro-propagation est le suivant :

1- Production de 50 plants en CIV à partir de bourgeons axillaires sur milieu « bactériologique » pour garantir également l'absence de bactéries (*Ralstonia* spp, *Erwinia* spp et *Xanthomonas* spp).

2- Les petits plants sont gardés confinés en chambre de culture.

3- Une nouvelle indexation vis-à-vis des mêmes virus que décrits précédemment est réalisée sur ces cinquante plants. Si les plants sont sains, ils sont alors destinés à la production de nouveaux rejets qui deviendront le matériel source pour la CIV. Pour cela, les plants sont ensuite conservés en serre *insect-proof* et indexés périodiquement.

4- Les bourgeons axillaires de ces nouveaux rejets sont utilisés pour une micro-propagation de masse in vitro. Les vitroplants sont alors envoyés par avion à un pépiniériste 'agréé par la DAAF' qui réalise en Martinique l'acclimatation, le sevrage et la croissance initiale avant leur livraison aux producteurs. Ce processus de régénération de plants in vitro et la production des vitro-plants prêts à être livrés demandent environ 1,5 à 2 ans.

- Si l'indexation du plant initial révèle qu'il n'est pas sain, le processus de micro-propagation inclut une phase d'assainissement qui dure environ six mois et est mise en œuvre avant d'entreprendre l'étape 1 de la CIV décrite ci-dessus :

1- La technique d'étiollement des bourgeons axillaires à l'obscurité est réalisée en CIV.

2- Les bourgeons terminaux des plants étiolés sont mis en CIV pour régénérer de petits plants in vitro.

3- Ces petits plants subissent une nouvelle indexation pour les virus (PMWaV1 et PMWaV2, PBCOV, PBERV et TSWV) et les plants assainis entrent ensuite dans le même processus décrit précédemment pour des plants sains.

Ce processus complet d'assainissement demande environ six mois et la durée totale du cycle de multiplication est alors portée à un peu moins de 3 ans.

Mealybug wilt disease of pineapple in Reunion Island: epidemiological survey and assessment of viral metagenomic diagnosis

Pineapple (*Ananas comosus*, cultivar 'Queen Victoria') is Reunion's leading fruit crop and main export. Pineapple mealybug wilt disease (MWD), commonly known as 'wilt', has been affecting pineapple plantations in Reunion since 2014. The disease is present in all pineapple-growing areas worldwide, and leads to yield reductions of up to 80%. It is characterized by typical leaf symptoms of reddening, yellowing, wilting, desiccation and bending. MWD is thought to have a multifactorial origin, involving a complex of different viruses including several ampeloviruses, called pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs), and several badnaviruses, called pineapple bacilliform viruses (PBVs). However, the role of these viruses in the etiology of MWD remains poorly understood.

In this thesis, we firstly carried out a field survey in Reunion, which enabled a detailed analysis of the symptoms and prevalence of viruses supposedly involved in MWD (PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PBCOV and PBERV). It showed that most plants of this survey (93%) were infected with at least one of these five viruses, and that co-infections with at least two of these viruses were frequent (76%). PMWaV1, PMWaV2 and PMWaV3 appeared to contribute to symptoms aggravation, particularly in cases of co-infection. The involvement of other biotic and abiotic factors confirmed that MWD has a complex multifactorial origin, and should be requalified as a syndrome. Comparative analysis of pineapple plots grown from suckers or vitroplants (VP) over several production cycles showed that pineapples grown from VPs have an average lower rate of infection over time, suggesting that the use of VPs improves the sanitary status of pineapple crops and has the potential to limit the impact of MWD in Reunion.

The second part of this thesis focused on the evaluation of five second- and third-generation high-throughput sequencing (HTS) approaches for the diagnosis of pineapple viruses. This study showed that the combination of a short reads approach (Illumina sequencing from ribodepleted total RNA) and a long reads approach (Nanopore MinION sequencing from total RNA) enabled the simultaneous detection and assembly of nine complete or near-complete genomes of viruses from genera *Ampelovirus* (*Closteroviridae*), *Badnavirus* (*Caulimoviridae*), *Sadwavirus* (*Secoviridae*) and *Vitivirus* (*Betaflexiviridae*). Our results highlight the potential of combined HTS approaches for characterizing the diversity of phytoviruses and for virological indexing aimed at assessing the health status of pineapple crops.

Keywords: mealybug wilt disease of pineapple (MWD); etiology; prevalence; pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs); viral metagenomics; high-throughput sequencing (HTS); diagnosis; diversity.

La maladie du dépérissement de l'ananas à La Réunion : enquête épidémiologique et évaluation du diagnostic métagénomique viral

L'ananas (*Ananas comosus*, cultivar 'Queen Victoria') est la première culture fruitière de La Réunion et son principal produit d'exportation. La maladie du dépérissement de l'ananas ou *mealybug wilt disease of pineapple* (MWD), communément appelée 'wilt', affecte les plantations réunionnaises depuis 2014. Elle est présente dans l'ensemble des zones de culture d'ananas dans le monde, et entraîne des baisses de rendement pouvant atteindre 80%. La maladie se manifeste notamment par des symptômes foliaires de rougissement, jaunissement, flétrissement, dessèchement et incurvation. Elle aurait une origine multifactorielle impliquant un complexe de différents virus dont des ampelovirus, les pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV), et des badnavirus, les pineapple bacilliform virus (PBV). Le rôle précis de ces virus dans l'étiologie de la MWD reste néanmoins mal compris.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord conduit une enquête de terrain à La Réunion, qui a permis une analyse détaillée des symptômes et de la prévalence des virus présumés être impliqués dans la MWD (PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3 PBCOV et PBERV). Elle a montré que la majorité des plants (93%) étaient infectés par au moins un de ces cinq virus et que les co-infections par au moins deux de ces virus étaient fréquentes (76%). Les PMWaV1, PMWaV2 et PMWaV3 semblaient contribuer à l'aggravation des symptômes, notamment dans les cas de co-infection. L'intervention d'autres facteurs biotiques et abiotiques confirment que la MWD aurait une origine multifactorielle complexe permettant de la requalifier en syndrome. L'analyse comparative de parcelles d'ananas issues de rejets traditionnel ou de vitroplants (VP) pendant plusieurs cycles de production a montré que les ananas issus de VP présentent en moyenne un faible taux d'infection par le PMWaV1 et le PMWaV3 au cours du temps, et suggère que leur utilisation permet d'améliorer l'état sanitaire des cultures d'ananas et de limiter l'impact de la MWD à La Réunion.

La deuxième partie de cette thèse a porté sur l'évaluation de cinq approches de séquençage haut débit (HTS) de deuxième et troisième génération pour le diagnostic des virus infectant l'ananas. Cette étude a montré que la combinaison d'une approche *short reads* (séquençage Illumina à partir d'ARN total ribodéplété) et d'une approche *long reads* (séquençage Nanopore MinION à partir d'ARN total) permettait la détection simultanée et l'assemblage de neuf génomes complets ou quasi complets de virus appartenant aux genres *Ampelovirus* (*Closteroviridae*), *Badnavirus* (*Caulimoviridae*), *Sadwavirus* (*Secoviridae*) et *Vitivirus* (*Betaflexiviridae*). Ces résultats soulignent l'intérêt des approches combinées de HTS pour la caractérisation de la diversité phytovirale et l'indexation virologique à des fins d'évaluation de l'état sanitaire des cultures d'ananas.

Mots clés : maladie du dépérissement de l'ananas (MWD) ; étiologie ; prévalence ; pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaV) ; métagénomique virale ; séquençage haut débit (HTS) ; diagnostic ; diversité.