



**HAL**  
open science

## Comparaison des méthodes de détection des mosaïques des blés (Bymovirus et Furovirus) par marquage moléculaire et par détection sérologique

Valerie Cadot, Michel Bonnefoy, Mathieu Rolland, Delphine Hourcade, Céline Andro, Audrey Delaunay, Céline Vandecasteele, Sophie Perrot, Olivier Herbert, Veronique Viader, et al.

### ► To cite this version:

Valerie Cadot, Michel Bonnefoy, Mathieu Rolland, Delphine Hourcade, Céline Andro, et al.. Comparaison des méthodes de détection des mosaïques des blés (Bymovirus et Furovirus) par marquage moléculaire et par détection sérologique. *Innovations Agronomiques*, 2014, 35, pp.107-117. 10.17180/9kvd-5a10 . hal-04522243

**HAL Id: hal-04522243**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04522243>**

Submitted on 26 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

## Comparaison des méthodes de détection des mosaïques des blés (Bymovirus et Furovirus) par marquage moléculaire et par détection sérologique

Cadot V.<sup>1</sup>, Rolland M.<sup>1</sup>, Bonnefoy M.<sup>2a</sup>, Hourcade D.<sup>2b</sup>, Andro C.<sup>1</sup>, Delaunay A.<sup>1</sup>, Vandecasteele C.<sup>1</sup>, Perrot S.<sup>1</sup>, Herbert O.<sup>1</sup>, Viader V.<sup>3</sup>, David J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> GEVES- 25 Rue Georges Morel - 49071 Beaucouzé Cedex

<sup>2</sup> ARVALIS Institut du Végétal- 2a : 45, voie Romaine - BP 23, 41240 Ouzouer-Le-marché ; 2b: 6, chemin de la Côte Vieille, 31450 Baziège

<sup>3</sup> INRA, SupAgro Montpellier – UMP AGAP, 2, Place P. Viala, 34060 Montpellier Cedex 1

Correspondance : valerie.cadot@geves.fr

### Résumé

Le virus de la mosaïque des céréales, Soil-Borne Cereal Mosaic (SBCMV) et le Virus des stries en fuseau du blé, Wheat Spindle Streak Mosaic Virus (WSSMV) sont des virus à ARN transmis par un micro-organisme du sol : *Polymyxa graminis*. Les cultures de blé sont de plus en plus touchées par ces virus, entraînant d'importantes pertes de rendement et seules les résistances variétales permettent actuellement de lutter contre ces mosaïques. Actuellement, des tests sérologiques (ELISA) sont réalisés en appui des notations visuelles pour confirmer la résistance variétale, dans le cadre de l'inscription des variétés de blé au Catalogue national par le GEVES et de la post inscription par ARVALIS Institut du Végétal. Mais depuis 2009, des interrogations ont été soulevées sur les performances durables des sérums selon le fournisseur. L'objectif de cette étude est de définir une méthode de détection de référence fiable pour confirmer la résistance des variétés de blé au WSSMV (bymovirus) et au SBCMV (furovirus), en fonction de la reproductibilité, de la sensibilité, et du coût des méthodes. En 2009-2010, les laboratoires ont optimisé une méthode de détection moléculaire par RT-PCR, en choisissant les couples d'amorces de Vaïanopoulos, (2006) c2F/c1R pour le WSSMV et FURO2-F/R (2009) pour le SBCMV, optimisée en 2010 par BioGEVES, suivi d'une lecture par gel d'agarose. En 2010-2011, des ring tests ont montré une très bonne reproductibilité des tests RT-PCR (>95%), avec de rares cas de faux positifs, et une bonne reproductibilité des tests ELISA (>=89%), avec quelque cas de faux négatifs, en lien avec la sensibilité de chaque méthode. Une méthode RT-PCR simplifiée, Jus GES, n'a pas été retenue, en raison d'une sensibilité inférieure aux tests ELISA, malgré son coût inférieur à la RT-PCR. Pour l'inscription des variétés de blé au Catalogue, la méthode de détection de référence reste le test DAS-ELISA, mené par le GEVES. Cette méthode a prouvé sa robustesse avec une bonne concordance avec les notations visuelles, une sensibilité suffisante et un coût huit fois moins élevé que la RT-PCR. Mais en cas de sérums défectueux, il sera à présent possible de recourir à un test par RT-PCR ; cette prestation étant maintenant proposée à toute la filière par le GEVES. Pour les variétés en post-inscription, la méthode retenue est la méthode moléculaire par RT-PCR.

**Mots clés** : SBCMV, WSSMV, blé, diagnostic RT- PCR, résistance variétale, Catalogue français, méthode de référence

### Abstract: Comparison of detection methods of wheat mosaic using molecular markers and serological tests

The mosaic viruses of cereals, Soil-Borne Cereal Mosaic (SBCMV) and Wheat Spindle Streak Mosaic Virus (WSSMV) are RNA viruses transmitted by a soil microorganism: *Polymyxa graminis*. Wheat crops are increasingly affected by the virus, resulting in large yield losses and up to now, only the varietal resistance makes it possible to fight against these mosaics. Currently, serological tests (ELISA) are performed to support visual scores in order to confirm varietal resistance in the context of varieties

registration in the National Catalogue by GEVES and as part of post registration tests by ARVALIS Plant Institute. But since 2009, questions have been raised concerning the stability of sera performance depending on the supplier. The objective of this study was to define a reliable reference method to confirm the resistance of wheat varieties to WSSMV (bymovirus) and to SBCMV (furovirus), depending on the reproducibility, sensitivity, and cost of methods. In 2009-2010, the laboratories optimized a method for molecular detection by RT-PCR, by choosing primer pairs of Vaianopoulos (2006) c2F/c1R for WSSMV and FURO2-F / R for SBCMV, (2009) optimized by BioGEVES in 2010, followed by agarose gel electrophoresis. In 2010-2011, ring tests showed a very good reproducibility of RT-PCR tests (> 95%), with rare cases of false positives, and a good reproducibility of ELISA tests (> = 89%), with some cases of false negatives, in connection with the sensitivity of each method. A simplified RT-PCR protocol, "Jus GES", was not retained, due to a lower sensitivity than ELISA tests, despite its lower cost than RT-PCR. For the registration of wheat varieties to the French catalogue, the detection reference method remains the DAS-ELISA test, conducted by GEVES. This method has proven its robustness with a good concordance with the visual scores, a sufficient sensitivity and a cost eight times lower than RT-PCR. But in case of defective sera, it will now be possible to use a test by RT-PCR; this service is now offered to the whole seed supply chain by GEVES. For the varieties in post-registration, the method used is the molecular method by RT-PCR.

**Keywords:** SBCMV, WSSMV, wheat, diagnostic RT-PCR, varietal resistance, French catalog, reference method

## Introduction

Deux virus à ARN, le Furovirus, Soil-Borne Cereal Mosaic Virus (SBCMV), Mosaïque des Céréales et le Bymovirus : Wheat Spindle Streak Mosaic Virus (WSSMV), Mosaïque des Stries en fuseau, sont transmis dans le sol par *Polymyxa graminis*.

Le blé tendre est surtout affecté par le SBCMV, avec des chutes de rendement pouvant aller de 20 à 80 %, et seulement 20% de variétés résistantes (résistance partielle, au niveau du plateau de tallage).

Le blé dur est fortement affecté par le WSSMV, qui est en augmentation depuis 2005, avec des pertes pouvant atteindre 100% et seules les résistances variétales permettent aujourd'hui de lutter contre ces mosaïques. Aucune variété de blé dur inscrite n'est résistante au WSSMV, excepté Soldur présentant une résistance partielle mais un faible potentiel agronomique et technologique. Les blés atteints par l'un ou l'autre de ces virus se caractérisent dans un premier temps (tallage) par des jaunissements, des rougissements et une réduction de la croissance et du tallage, puis par la présence de tirets verts clairs sur la longueur de la feuille, plus visibles sur les jeunes pousses qui peuvent se nécroser. Dans le cas du SBCMV, on observe aussi un nanisme lors de la montaison.

Dans le cadre de l'inscription des variétés au catalogue national, le GEVES évalue pendant deux ans la résistance des variétés aux mosaïques des céréales, à la demande de l'obtenteur, avec attribution de bonus si la variété est résistante aux deux virus. La résistance variétale est évaluée par notation visuelle au champ dans trois sites contaminés, avec confirmation par test ELISA des virus présents. En post-inscription, ARVALIS réalise le même type d'études. Actuellement, la technique ELISA permet d'obtenir des résultats fiables, mais elle a cependant un niveau de sensibilité limité par rapport à des techniques plus récentes. Par ailleurs, sa mise en œuvre nécessite l'utilisation de sérums, produits dont les performances fluctuent en fonction du fournisseur et peuvent être altérées au cours du temps. L'identification des virus via une méthode moléculaire fondée sur la détection de séquences spécifiques du génome du virus, pourrait pallier ces problèmes et présenterait l'avantage de ne pas nécessiter de sérum. Dans le cadre d'une collaboration financée par le Ministère de l'Agriculture, le GEVES,

ARVALIS-Institut du végétal, l'INRA, SupAgro Montpellier, et GALYS ont mené une étude de comparaison des méthodes sérologiques et moléculaires, afin d'en évaluer les performances.

Il s'agissait donc dans le cadre de l'inscription et de la post inscription, de définir la méthode de référence pour confirmer la résistance des variétés de blé au WSSMV et/ou au SBCMV, en prenant en compte la reproductibilité, la sensibilité, et le coût des méthodes.

La démarche a consisté à :

- Optimiser une technique de détection par RT-PCR du SBCMV et du WSSMV, notamment sur le choix des amorces et la méthode de conservation des échantillons avant analyse.
- Comparer par ring test la détection des virus, avec des méthodes moléculaires et sérologiques, en lien avec les notations visuelles :
  - o En 2010 sur des variétés au comportement de résistance connu
  - o En 2011 en grandeur réelle, sur les variétés en étude CTPS pour l'inscription au Catalogue, et sur les variétés en post inscription
- Réaliser une analyse des coûts entraînant en 2012 l'étude supplémentaire d'une méthode RT-PCR simplifiée moins coûteuse, nommée Jus GES.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal

#### Echantillons analysés en 2010 (Tableau 1)

En 2010, 12 variétés, au comportement de résistance connu et notamment les 4 témoins CTPS, ont été implantées dans 4 sites contaminés et en module climatique, indemne de virus. Une notation visuelle a été réalisée sur chaque variété à 2 dates, suivie de prélèvements de plantes pour les analyses sérologiques et moléculaires (ce qui représentait au total un prélèvement de 60 échantillons).

Espèces	Variétés	Comportement attendu de la résistance		Modalités d'essais				
		SBCMV	WSSMV	Chambon	Oizon	Marmagne	Pray	Module
				SBCMV + WSSMV	SBCMV + WSSMV	SBCMV	WSSMV	indemne virus
Blé tendre	Cézanne*	S	S	X	X	X	X	X
	Aztec*	S	R	X	X	X		X
	Virlor*	R	S	X	X	X	X	X
	Trémie*	R	R	X	X	X	X	X
	Charger	R	R	X				
	Altigo	R	R	X			X	
	Mercato	S	R	X				
	Boregard	S	R	X				
	Timing	S	R	X				
Blé dur	Soldur	S?	T?	X			X	
	Lloyd	S	S				X	
	Aronde	R	S	X			X	

Tableau 1 : Matériel végétal et lieux d'essais en 2010 (\* : Témoins CTPS)

### **Echantillons analysés en 2011**

Le test en grandeur réelle sur la campagne 2011, par ELISA et RT-PCR a porté sur 71 échantillons par date de prélèvement, soit 426 échantillons, avec deux prélèvements pour l'ensemble des quatre laboratoires au lieu de 90 échantillons/laboratoire initialement prévu.

- 15 variétés de blé tendre d'hiver CTPS, comprenant les 4 témoins CTPS et 11 variétés en demande d'inscription, sur 2 lieux (Chambon et Oizon)
- 30 variétés en post inscription à Chambon et 7 variétés à Pray, comprenant 27 variétés de blé tendre, 7 variétés de blé dur et 3 variétés de triticale.

Les 4 témoins CTPS, ont été cultivés dans un module de la SNES, indemne de virus pour servir de témoins négatifs pour chacun des laboratoires.

### **Echantillons analysés en 2012**

22 échantillons, comprenant les témoins CTPS ont été notés visuellement et prélevés dans 3 lieux (Chambon, Oizon et Marmagne) pour juger de la robustesse et de la sensibilité de la méthode Jus GES par rapport à l'ELISA et à la RT-PCR.

## *Méthodes*

### **Dispositif expérimental au champ**

Cinq modalités ont été choisies, dont quatre lieux d'essais contaminés par SBCMV et/ou WSSMV, utilisés depuis longtemps dans les réseaux d'inscription CTPS, coordonnés par le GEVES et de post inscription, administrés par ARVALIS. L'objectif est de pouvoir évaluer la résistance variétale au champ dans des environnements connus et variables pour ces deux mosaïques.

- 1) Chambon (45) : lieu CTPS et post inscription : SBCMV et WSSMV présents.
- 2) Oizon (18) : lieu CTPS : SBCMV est majoritaire, et extension de WSSMV depuis 2009.
- 3) Marmagne (18) : lieu CTPS : SBCMV uniquement.
- 4) Pray (45) : lieu post inscription : WSSMV est majoritaire, avec des traces de SBCMV.
- 5) Module climatique de la SNES : lieu indemne de virus, servant à valider les témoins négatifs.

### **Test de résistance au champ**

L'échelle de notation visuelle pour évaluer la résistance aux deux virus est celle du protocole CTPS. Deux notations visuelles ont été réalisées dans chacun des lieux.

Echelle de notation :

0 = absence de symptômes	}	Résistant : 0 et 1
1 = doute		
2 = légers symptômes	}	Sensible : 2 à 5
3 = symptômes légers présents sur l'ensemble de la parcelle		
4 = symptômes soutenus présents sur l'ensemble de la parcelle		
5 = très forts symptômes présents sur l'ensemble de la parcelle.		

### **Mode de prélèvement**

Le protocole de prélèvement et d'échantillonnage des plantes au champ a été défini pour confirmer la résistance par détection sérologique et moléculaire. Deux prélèvements sont réalisés, sitôt après la notation visuelle, en choisissant les plantes présentant des symptômes (si sensibles), à raison de 10 plantes/échantillon. Le premier prélèvement a porté sur la plantule entière, sans les racines, avec des plantules différentes issues de la même répétition pour chacun des quatre laboratoires.

Le second prélèvement a eu lieu 3 à 5 semaines après le premier, et a porté sur des plantes suffisamment développées pour pouvoir être partagées entre la SNES et BioGEVES pour les tests ELISA et moléculaires. Pour GALYS et ARVALIS, pour des raisons de simplification, les échantillons sont issus de plantes différentes mais proviennent des mêmes répétitions.

### **Analyses par laboratoire**

- La SNES et GALYS ont réalisé les tests ELISA sur toutes les variétés, en demande d'inscription et en post inscription.
- L'INRA et SupAgro Montpellier ont participé à l'optimisation des tests RT-PCR et Jus GES ainsi qu'à l'étude de l'inoculation de ces virus en conditions contrôlées (résultats non présentés).
- BioGEVES a testé par RT-PCR toutes les variétés en demande d'inscription ainsi que des variétés en post inscription pour avoir des données communes avec ARVALIS.
- ARVALIS, pour des raisons de confidentialité, a testé par RT-PCR uniquement le matériel en post inscription ainsi que les témoins CTPS.

### **Méthode de conservation des échantillons**

- Conservation des échantillons secs dans des sacs en papier à l'air libre. Les échantillons ont été conservés pendant 6-7 mois dans des sacs en papier par BioGEVES et par ARVALIS, à température ambiante, après avoir séché les échantillons et enlevé les racines.
- Lyophilisation : l'INRA et SupAgro Montpellier ont comparé le mode de conservation en sec et lyophilisé à partir d'échantillons de l'année en cours

### **Test RT-PCR**

#### **Echantillonnage**

- 10 talles/échantillon issues de plantes différentes avec symptômes (si variété sensible) ont été prélevées puis broyées en bulk.

#### **Prélèvements**

- Prélèvement 1 au stade plantule : prélèvement de la dernière feuille étalée et bout de feuille enroulée de chaque talle/plante
- Prélèvement 2 au stade montaison : prélèvement de 5 à 7 cm de la dernière feuille étalée de chaque talle

#### **Broyage**

- Pool des morceaux de feuilles de chaque variété et broyage en godet de 50 mL avec le vibrobroyeur MM400 Retsch + 1 bille 20 mm, 30sec à 25 Hz et 30 sec à 30Hz pour BioGEVES.
- Pool des morceaux de feuilles de chaque variété et broyage en godet de 35 ml avec le vibrobroyeur MM300 + 1 bille de 9mm pendant 1mn à 30 Hz pour ARVALIS

#### **Extraction d'ARN total par Rneasy mini kit de Qiagen**

- 2 prises d'essai/broyat, avec 25 à 30 mg de poudre du pool, ont été effectués (=2 extractions ARN) et 2 points PCR par prise d'essai.

#### **Reverse transcription**

- par Kit RT Promega : « Reverse Transcription System ». Dilution ADNc au 1/10<sup>e</sup>

#### **Couples d'amorces testées**

- 4 couples pour SBCMV et 6 pour WSSMV (Tableau 2)

Virus	Références bibliographiques	Couple d'amorces	Séquences des couples d'amorces
<b>SBCMV</b>	Deb M. & Anderson J. M. (2008) : 219 pb	SBMV L2 SBMV R2	CCTATGGCGTCCTAACGTGT CACAATCTGCAGGAAGACGA
	Budge <i>et al.</i> (2008) : 401 pb	RNA2F RNA2R	GAGTGCTCAGTGAAACTGCTAAC RNA2R (TGACGGCAACGACGTGTCT
	Vaïanopoulos <i>et al.</i> (2009) : 191 pb	FURO-1F FURO-1R	GGCCATCAGGATAGATGG GGGGATTTGAACCCCTCT
	Vaïanopoulos optimisée BioGEVES (2010) : 190 pb	FURO 2-F FURO-2R	GCCATCAGGATAGATGGTTCTG GGGGATTTGAACCCCTCT
<b>WSSMV</b>	Deb M. & Anderson J. M. (2008) : 155 pb	WSSMV L1 WSSMV R1	GCAACCCTTAGCGAAGTCAG GAGGCTCCGTGTCTCATAGC
	Gitton F. <i>et al.</i> (1999)	Fw4 Rw4	AAGGAAATAAATACCGCCCCAG TCATACCCGACTCTTCCAGCAC
	Clover G.R.G. <i>et al.</i> (1999) : 882 pb	WMVCPR WMVCPF	GGTTAGCTCTGGRTGTCCATCAG GCTGCGGACACACAAACWGACG
	Vaïanopoulos <i>et al.</i> (2006) : 199 pb	WSSMV c2F WSSMV c1R	GCAACCCTTAGCGAAGTCAG AGGGACGTGGAACAAAGAAA
	Vaïanopoulos <i>et al.</i> (2006): 200 pb	WSSMV 1F WSSMV1-1R,	AGCAACCCTTAGCGAAGT AGGGACGTGGAACAAAGA
	Vaïanopoulos <i>et al.</i> (2006): 200 pb	WSSMV c1F WSSMV c1-R	AGCAACCCTTAGCGAAGTCA AGGGACGTGGAACAAAGAAA

**Tableau 2** : Liste des couples d'amorces testés pour la détection du SBCMV et du WSSMV

### Lecture

- par électrophorèse sur gel d'agarose avec révélation au Bromure d'Ethidium.
- par électrophorèse capillaire. Les amorces sont marquées par les fluorochromes FAM et VIC.

### Tests DAS ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés selon le mode opératoire fournis par Sediag pour la réalisation de tests DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich – Enzyme Linked immuno Assay) pour les 2 virus SBCMV et WSSMV.

### Sérum

Les sérums pour la SNES et GALYS proviennent du même fournisseur Sediag, après une étude antérieure ayant porté sur la comparaison de sérums de différents fournisseurs :

- pour WSSMV : sérum monoclonal
- pour SBCMV : sérum polyclonal

### Echantillonnage

10 plantes/échantillon ont été réparties en 5 bulks de 2 plantes. Chaque bulk a été testé sur 2 répétitions (2 puits).

### Mode de prélèvement

- Le premier prélèvement est réalisé au stade plantule sur toutes les feuilles,
- Le deuxième prélèvement est réalisé sur les 7 derniers cm de la plus jeune feuille étalée encore verte avec un maximum de symptômes.

### Analyse des résultats

La valeur des DO est interprétée après soustraction du témoin blanc ; chaque plaque est analysée en fonction de ses témoins sains et positifs :

- Echantillon négatif : DO <2x DO Témoin sensible

- Echantillon douteux :  $2x DO \text{ Témoin sensible} < DO < 3x DO \text{ Témoin sensible}$
- Echantillon positif :  $DO > 3x DO \text{ Témoin sensible}$ .

### **Test Jus GES**

Le test de détection Jus GES est une PCR simplifiée réalisée sur jus de plante cru, avec une étape d'extraction simplifiée d'ARN. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un tampon GES libérant l'ARN par simple chauffage (Osman, 2007) suivie ensuite d'une RT-PCR classique. Cette méthode a été testée en 2012, et comparée aux tests ELISA et RT-PCR, en terme de robustesse et en terme de sensibilité, suite à son utilisation par Supagro Montpellier pour éventuellement abaisser le coût des tests RT-PCR basé sur l'extraction d'ARN par Kit, jugés très onéreux.

### **Analyse de la sensibilité des méthodes RT-PCR, ELISA et Jus GES**

Pour comparer la sensibilité des trois méthodes, Jus GES, RT-PCR et ELISA, une gamme de sensibilité artificielle a été créée en mélangeant des plantes sensibles de la variété Cézanne (sensible au SBCMV et au WSSMV) et des plantes saines cultivées en module. Pour l'ELISA et le Jus GES, les échantillons et les gammes de dilutions sont communs. Ces gammes de dilution ont été réalisées par mélange de jus de plantes sensibles et de plantes saines, allant de 1/10<sup>ème</sup> (1 volume de jus de plante sensible dans 9 volumes de jus de plante saine) à 1/1000. Un témoin positif et un témoin négatif ont également été inclus. Pour la RT-PCR, la dilution de l'ADNc au 1/10 a permis d'augmenter la gamme jusqu'à 1/10 000, en la basant sur des volumes de poudre broyée de plantes sensibles de Cézanne et de plantes saines.

## **Résultats**

### *Optimisation de la méthode de détection RT-PCR*

#### **Choix des amorces RT-PCR**

A partir des références bibliographiques, SupAgro Montpellier, ARVALIS et BioGEVES ont testé plusieurs paires d'amorces pour définir les meilleurs couples d'amorces détectant le SBCMV et le WSSMV

La démarche a consisté en :

- Recherche des accessions disponibles en ligne et alignement des séquences afin de tester in-silico la spécificité des amorces sélectionnées.
- Test RT-PCR pour détection : avec présence des virus sur les variétés sensibles et absence sur les variétés résistantes sur le lieu de Chambon.

#### **Pour le Furovirus SBCMV (Tableau 3)**

BioGEVES a adapté en 2010 le couple d'amorces de Vaïanopoulos 2009 FURO1-F/R pour donner le couple FURO2-F/R qui permet d'amplifier à la fois RNA1 et 2 (pouvant prévenir le risque de dégradation d'ARN et d'éviter les dimères).

Parmi les trois couples d'amorces FURO1-F/R, FURO2-F/R et RNA2F/R qui fonctionnent, le couple FURO2-F/R a été retenu. Les amorces de Deb 2008, SBMV L2/R2, n'ont pas donné d'amplification.

#### **Pour le Bymovirus WSSMV (Tableau 3)**

Les 3 laboratoires ont retenu le couple d'amorces WSSMV c2F/c1R (Vaianopoulos et al., 2006) parmi les 6 couples testés, sur la base de critères de spécificité, de risque de dimères pouvant diminuer l'amplification (Deb et al., 2008) et de taille d'amplicon trop grande (Clover, 1999) nécessitant une bonne conservation de l'ARN et l'ADNc.



Virus	Amorces publiées :					
	Deb et Anderson. 2008	Vaïanopoulos et al., 2009 (SBCMV) et 2006 (WSSMV)	Vaïanopoulos optimisée, BioGEVES, 2010	Budge et al. 2008	Gitton et al. 1999	Clover et al., 1999
<b>SBCMV</b>	SBMV L2/R2	FURO-1F/1R	<b>FURO2-F/R (sur 2 ARN)</b>	RNA2F/R		
<b>WSSMV</b>	WSSMV L1/R1 <i>Risque de dimères</i>	<b>WSSMV c2F/c1R</b> WSSMV 1F/R, WSSMVc1F/R		-	FW4 /RW4	WMVCPF/ WMVCPR

**Tableau 3** : Couples d'amorces testés pour le WSSMV et le SBCMV (Problème en italiques). Les amorces retenues sont entourées en rouge

### Méthode de conservation

Deux méthodes de conservation des échantillons ont été testées car le Furovirus semble moins concentré dans la plante que le Bymovirus lorsque les symptômes visuels sont présents.

#### Conservation des échantillons secs dans des sacs en papier à l'air libre

Les 2 virus sont bien détectés sur les échantillons conservés pendant 6-7 mois dans des sacs en papier par le BioGEVES et par ARVALIS, à température ambiante, après avoir séché les échantillons et enlevé les racines. Cette méthode de conservation simple en termes de coût et de faisabilité a été validée pour le CTPS.

#### Lyophilisation

Cette méthode a été initialement testée par l'INRA et SupAgro Montpellier pour étudier la possibilité de constituer une banque de virus pour une étude épidémiologique et un état des lieux à l'échelle de la France.

Le résultat est que la lyophilisation permet une longue conservation mais demande d'adapter le protocole de broyage. Cette méthode de conservation n'a pas été retenue pour le CTPS car plus coûteuse et pas plus efficace que la première.

### Validité des méthodes de détection

A partir de l'analyse des témoins CTPS des essais de 2010, 100% de réponses similaires entre les méthodes ELISA et RT-PCR ont été obtenues, avec des résultats conformes à l'attendu (Tableau 4).

#### Capacité de détection

Témoins CTPS	Sensibilité connue SBCMV WSSMV	Site et présence des virus											
		Chambon (+ +)			Oizon (+ +)			Pray (- +)			Marmagne (+ -)		
		PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note
Cézanne	S / S	++	++	3	++	++	3	-+	-+	3	+-	+-	2
Aztec	S / R	+-	+-	2	+-	+-	3	--	--	0	+-	+-	2
Virlor	R / S	-+	-+	3	-+	-+	4	-+	-+	4	--	--	0
Trémie	R / R	--	--	0	--	--	0	--	--	0	--	--	0

**Tableau 4.** Résultats RT-PCR et ELISA sur des échantillons de statut connu (+: présence, -: absence) ; SBCMV en bleu, WSSMV en rouge; S: sensible; R: résistant; Note visuelle : de 0 (absence de symptômes) à 5 (forts symptômes)

### Reproductibilité des méthodes

Les analyses de détection des 2 virus sur plus de 100 échantillons sur 2010-2011 ont révélé une très bonne reproductibilité de la RT-PCR ( $\geq 95\%$ ), avec de rares cas de faux positifs, et une bonne reproductibilité pour l'ELISA ( $\geq 89\%$ ), avec quelques cas de faux négatifs pour le SBCMV, en lien avec la sensibilité des méthodes (Tableau 5).

% reproductibilité	SBCMV	WSSMV	Nb échant.
ELISA (GEVES-GALYS)	89%	94%	141
RT-PCR (GEVES-ARVALIS)	95%	96%	106

**Tableau 5.** Reproductibilité des méthodes ELISA et RT-PCR

### Etude de la sensibilité des méthodes de détection

L'objectif visé était de comparer la sensibilité de la méthode Jus GES, avec celle de la RT-PCR et de la méthode ELISA.

La méthode Jus GES s'est montrée moins sensible que l'ELISA, avec un seuil de détection à 3/10 pour le SBCMV et 100% plantes sensibles pour le WSSMV. Le test ELISA présente une sensibilité inférieure à la RT-PCR agarose, mais elle présente l'avantage d'obtenir des seuils de sensibilité identiques pour les 2 virus à 1/20 (Tableau 6), alors que la RT-PCR détecte le WSSMV jusqu'à 1/1000 et le SBCMV seulement jusqu'à 2/100. La méthode Jus GES n'a pas été retenue car d'une sensibilité inférieure à l'ELISA. Elle pose également des problèmes d'interprétation, en cas de traces, présente un coût supérieur à l'ELISA et nécessite d'avoir du matériel frais et en très bon état (capside intègre et ARN intègre).

Variété	Dilution	Jus GES		ELISA		RT-PCR	
		WSSMV	SBCMV	WSSMV	SBCMV	WSSMV	SBCMV
Cezanne  (sensible aux 2 virus)	100%	+	+	+	+	+	+
	3/10	-	+	+	+	nt	nt
	2/10	-	trace	+	+	nt	nt
	1/10	-	trace	+	+	nt	nt
	1/20	-	trace	+	+	nt	nt
	3/100	nt	nt	nt	nt	+	+
	2/100	nt	nt	nt	nt	+	+
	1/100	-	trace	-	-	+	-
	1/200	nt	nt	nt	nt	+	-
	1/1000	-	-	-	-	+	-
	1/10 000	nt	nt	nt	nt	-	-
0	-	-	-	-	-	-	

**Tableau 6 :** Bilan des sensibilités des méthodes ELISA, Jus GES et RT-PCR, selon la gamme de dilution par le GEVES (+: présence, -: absence, nt : non testé)

### Analyse des coûts

Le calcul du coût des tests, dans le cadre d'une évaluation CTPS, pour la détection des 2 virus a montré que les tests ELISA sont environ 8 fois moins cher que les tests RT-PCR par agarose. Ceci justifie l'étude de la méthode Jus GES qui présentait un coût intermédiaire entre les deux.

- test ELISA : 8.45 €,
- test PCR agarose : 67,3 €
- test PCR capillaire : 43.17 €

### *Etude des concordances entre les notations visuelles de résistance et les tests de détection*

Les résultats 2011 ont montré (Tableau 7) :

- une meilleure concordance des notations visuelles avec la RT-PCR avec lecture sur gel d'agarose que par capillaire, avec trop de faux positifs, en lien avec un seuil de sensibilité plus élevé,
- une relative bonne concordance entre les notations visuelles et les tests ELISA, en incluant les échantillons jugés douteux par ELISA,
- la variété de blé dur Soldur a été détectée positive au WSSMV par RT-PCR, dans le cas de plantes jugées douteuses visuellement, confirmant un mécanisme de résistance partielle de cette variété de blé dur, différent de la résistance du blé tendre.

Détection	Laboratoire	Prélèvement précoce		Prélèvement tardif	
ELISA	GEVES-SNES	92.3%	87%	95.1 % *	
	GALYS	100%	84%	96,6 % *	
RT-PCR agarose	BIOGEVES	97.8%	100%		
RT-PCR capillaire	ARVALIS	83.7%	95.6%		

**Tableau 7.** Evaluation du pourcentage de concordance entre la notation visuelle des symptômes et la détection réalisée par ELISA ou la RT-PCR (\* = corrélations incluant les échantillons douteux pour l'ELISA)

### **Conclusion**

Cette collaboration a permis de mettre au point une méthode efficace basée sur la RT-PCR pour la détection des virus responsables des mosaïques du blé et a confirmé les bons résultats de la méthode officielle (ELISA). Les organismes officiels disposent maintenant de deux outils de diagnostic performants.

Pour l'inscription des variétés de blé au Catalogue, la méthode de détection de référence reste le test DAS-ELISA mené par le GEVES. Cette méthode a prouvé sa robustesse et s'avère moins onéreuse que la RT-PCR. En cas de sérums défectueux ou de défaut de fourniture, il est à présent possible de recourir à un test par RT-PCR réalisé par le GEVES. Cette prestation est à présent proposée à la filière.

Pour les variétés en post-inscription, la méthode retenue est la méthode moléculaire par RT-PCR.

### **Remerciements**

Ce projet CTPS a été réalisé avec le concours financier du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt

### **Références bibliographiques :**

Budge G.E., Loram J., Donovan G., Boonham N., 2008. RNA2 of Soil-borne cereal mosaic virus is detectable in plants of winter wheat grown from infected seeds. *European Journal of Plant Pathology* 120, 97-102

Clover G.R.G., Henry C., 1999. Detection and discrimination of Wheat spindle streak mosaic virus and Wheat yellow mosaic virus using multiplex RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 105, 891-896.

Deb M., Anderson J.M., 2008. Development of a multiplexed PCR detection method for barley and cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 148, 17-24

Gitton F., Diao A., Ducrot O., Antoniw J.F., Adams M.J., Maraite H., 1999. A two-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection of Soilborne wheat mosaic virus Barley and Wheat spindle streak virus from France. *Plant Pathology* 48, 635-641.

Hourcade D., Cadot V., Rolland M, Bonnefoy M., Perrot S., Delaunay A., Guillier S., Viader V., 2012. Virus de la mosaïque du blé : recourir à la biologie moléculaire pour confirmer le diagnostic. *Perspectives agricoles* 387, 9-13

Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A., 2007. Real time RT-PCR (TaqMan R) assays for the detection of grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods* 141, 22-29.

Vaïanopoulos C., Legrève A., Lorca C., Moreau V., Steyer S., Maraite H., Bragard C., 2006. Widespread occurrence of Wheat spindle streak mosaic virus in Belgium. *Plant Disease* 90, 723-728

Vaïanopoulos C., Legrève A., Moreau V., Bragard C., 2009. Broad-spectrum detection and quantitation methods of Soil-borne cereal mosaic virus isolates. *Journal of Virological Methods* 159, 227-232