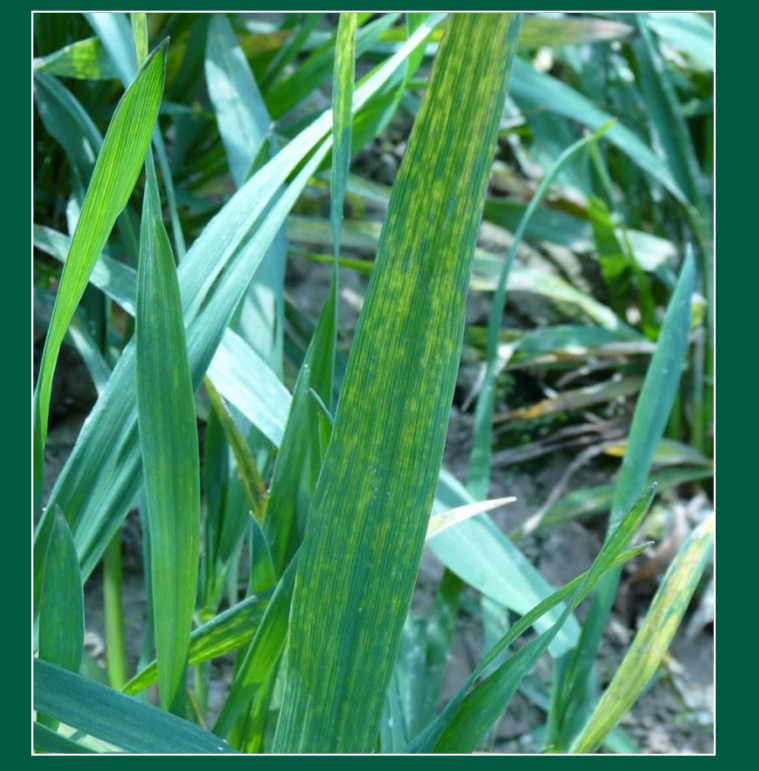




Comparaison des méthodes de détection des mosaïques des blés (Bymovirus et Furovirus) par marquage moléculaire et par détection sérologique

V. Cadot¹, M. Rolland¹, M. Bonnefoy^{2a}, D. Hourcade^{2b}, C. Andro¹, A. Delaunay¹, C. Vandecasteele¹, S. Perrot¹, O. Herbert¹, V. Viader³, J. David³

Contact : valerie.cadot@geves.fr



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 %, avec 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%. Aucune variété de blé dur inscrite n'est résistante à WSSMV, excepté Soldur présentant une résistance partielle mais de faible potentiel agronomique et technologique.

Dans le cadre de l'inscription des variétés au catalogue national, le **GEVES évalue pendant 2 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 3 sites contaminés, avec confirmation par test ELISA des virus présents. **En post inscription, ARVALIS réalise le même type d'études. Depuis 2009, des interrogations ont été soulevées sur la pérennité et la performance fluctuante des sérums** selon le fournisseur ainsi que sur le **développement de nouveaux outils moléculaires présentant un niveau de sensibilité plus élevé.**

Objectif

Dans le cadre de l'inscription et de la post inscription, définir la méthode de référence pour confirmer la résistance des variétés de blé au WSSMV et/ou au SBCMV, en fonction de la reproductibilité, de la sensibilité, et du coût des méthodes :

- Mettre au point une technique de détection par RT-PCR
- Comparer la RT-PCR, l'ELISA et les notations visuelles

* Choix des amorces PCR

- 3 laboratoires : SupAgro Montpellier, BioGEVES et Arvalis Institut du Végétal
- Extraction d'ARN par Kit
- 4 couples d'amorces pour SBCMV
- 6 couples d'amorces pour WSSMV

* Méthode de conservation

Conservation des feuilles par séchage à l'air libre et par lyophilisation

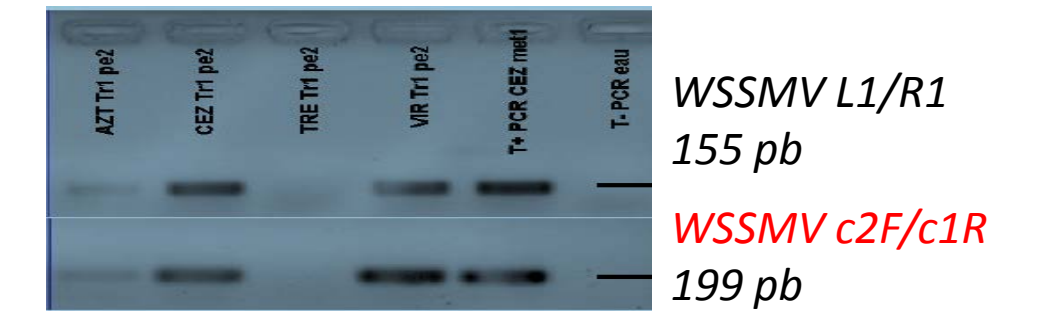
Optimisation de la méthode de détection RT-PCR

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

Tableau 1 : Couples d'amorces testés pour le WSSMV et le SBCMV. Amorces retenues Pb en italique

Sélection des amorces : (Cf tableau 1)

- Pour SBCMV : **FURO2-F/R**
- Pour WSSMV : **WSSMV c2F/c1R**



Conservation à l'air libre : aussi efficace que la méthode par lyophilisation et moins coûteuse

Validité des méthodes de détection

* Capacité de détection

- 4 témoins CTPS de blé tendre, de résistance connue
- 4 sites infectés par SBCMV et/ou WSSMV+ 1 module sans virus
- 10 talles/échantillon issus de plantes différentes ; 2 prélèvements

Test DAS-ELISA: sélection des sérums Sediag (SBCMV : polyclonal; WSSMV : monoclonal). 5 bulks de 2 plantes ; 2 puits/bulk ; Analyse des DO :

- **Négatif :** DO<2xDO Témoin sensible
- **Douteux :** 2xDO Témoin sensible<DO<3x DO Témoin sensible
- **Positif :** DO>3x DO Témoin sensible

Test RT-PCR : amorces définies Tableau 1 ; Extraction d'ARN total par Kit mini Rneasy de Qiagen ; Reverse transcription par Kit RT Promega 1 pool de 20 plantes, 2 prises d'essai/broyat ; 2 points PCR/prise d'essai

* Reproductibilité des méthodes

Ring test en 2010 et 2011 : tests ELISA entre GEVES & Galys ; RT-PCR entre GEVES (gel agarose) & Arvalis (capillaire), analyse de reproductibilité sur échantillons communs (blé tendre, blé dur et triticale).

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

Tableau 3. Reproductibilité des méthodes ELISA et RT-PCR

Très bonne reproductibilité de la RT-PCR entre GEVES et Arvalis (>=95%), avec de rares cas de faux positifs, et bonne pour l'ELISA (>=89%), avec quelque cas de faux négatifs pour le SBCMV, en lien avec la sensibilité des méthodes.

* Etude de la sensibilité des méthodes de détection

- Gamme comparative de dilution sur le témoin sensible aux 2 virus pour l'ELISA, la RT-PCR et Jus GES sur échantillons communs
- Jus GES (Osman, 2007) : PCR simplifiée sur jus cru (suspension virale), sans Kit d'extraction d'ARN

* Analyse des coûts

Calcul basé sur le nombre de variétés testées en routine au CTPS

Tests Elisa environ 8 fois moins onéreux que la PCR agarose, d'où l'étude de la Jus GES, présentant un coût intermédiaire.

Témoins CTPS	Sensibilité connue SBCMV WSSMV	Site et présence des virus											
		Chambon (+ +)			Oizon (+ +)			Pray (- +)			Marmagne (+ -)		
		PCR	ELISA	Note vis.	PCR	ELISA	Note vis.	PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note Vis.
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 2. Résultats 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)

100% de réponses similaires entre les méthodes ELISA et RT-PCR, avec des résultats conformes à l'attendu (Cf tableau 2)

Variété	Dilution	Jus GES		ELISA		RT-PCR	
		WSSMV	SBCMV	WSSMV	SBCMV	WSSMV	SBCMV
Cézanne	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 4 : Bilan des sensibilités des méthodes ELISA, Jus GES et RT-PCR, selon la gamme de dilution par le GEVES (+: présence, -: absence, nt : non testé)

Méthode Jus GES moins sensible que l'ELISA; elle-même moins sensible que la RT-PCR. Avantage de l'ELISA pour l'obtention de seuils de sensibilité identiques pour les 2 virus (1 plante infectée / 20 plantes).

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

En 2011 : test grandeur réelle sur 180 échantillons (CTPS et post inscription) sur blé tendre, blé dur et triticale. - 2 prélèvements de 20 plantes/échantillon

- Concordance note visuelle/détection du virus : *Note visuelle >2 et réaction + à l'1 des 2 virus * Note =0 ou 1 et réaction - aux 2 virus

Echelle de notation visuelle : 0 : absence, 1 : douteux, 2 : légers symptômes, 3 = légers symptômes sur l'ensemble de la parcelle, 4 : symptômes soutenus sur l'ensemble de la parcelle, 5 : très fort symptômes sur l'ensemble de la parcelle

1. Meilleure concordance des notations visuelles avec la RT-PCR agarose ; moins bonne avec RT-PCR capillaire, en prélèvement précoce, avec de faux positifs, en lien avec un seuil de sensibilité plus élevé.
2. Relative bonne concordance entre les notations visuelles et les tests ELISA, en incluant les échantillons jugés douteux.
3. La variété de blé dur Soldur a été détectée positive au WSSMV par RT-PCR, dans le cas de plantes jugées douteuses visuellement.

Détection	Laboratoire	Prélèvement précoce	Prélèvement tardif
ELISA	GEVES-SNES	92.3%	87%
	Galys	100%	84%
PCR agarose	BIOGEVES	97.8%	100%
PCR capillaire	Arvalis	83.7%	95.6%

Tableau 5. 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 2 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.

¹ GEVES- 25 Rue Georges Morel - 49071 Beaucouzé Cedex

² Arvalis Institut du Végétal- ^{2a} : 45, voie Romaine - BP 23, 41240 Ouzouer-Le-marché ; ^{2b} : 6, chemin de la Côte Vieille, 31450 BAZIEGE

³ SupAgro Montpellier - UMP AGAP, 2, Place P. Viala, 34060 Montpellier Cedex 1