

Seule la résistance variétale permet aujourd'hui de lutter contre les mosaïques du blé.

## Virus de la mosaïque du blé Recourir à la biologie moléculaire pour confirmer le diagnostic

Pour affiner l'évaluation de la résistance des blés aux virus de la mosaïque, le GEVES, ARVALIS-Institut du végétal et leurs partenaires ont testé la pertinence d'une méthode de détection par PCR pour garantir le diagnostic. Cette technique s'avère efficace et prometteuse.

**M**aladies virales transmises par un champignon du sol appelé *Polymyxa graminis*, les mosaïques du blé peuvent entraîner des pertes de rendements allant de 20 à 80 % en blé tendre et jusqu'à 100 % en blé dur. Il en existe deux types provoquées par deux virus à ARN : la mosaïque des céréales est due au VMC (virus de la mosaïque des céréales) appelé en anglais « soil-borne wheat mosaic virus » (SBWMV), virus appartenant au genre Furovirus, tandis que celle des stries en fuseau du blé est causée par le VSFV ou « wheat spindle streak mosaic virus » (WSSMV), qui appartient au genre Bymovirus.

### La résistance variétale déterminante

Pour se prémunir contre ces virus, un seul moyen : la résistance variétale. Or ces dernières années, la mosaïque des stries en fuseau sur blé dur s'est fortement développée dans les quatre régions de production que sont le Centre, le Poitou-Charentes, le Sud-Ouest et le Sud-Est. Et aucune variété de blé dur n'est résistante à ce virus mise à part Soldur, variété non multi-

pliée du fait de son potentiel agronomique limité. Le blé tendre, lui, est surtout touché par le SBWMV que l'on trouve dans la plupart des régions, et en particulier dans le Centre. Actuellement, seules 20 % des variétés cultivées sont résis-

**Enjeu économique important, la résistance des variétés de blé à la mosaïque est évaluée dans le cadre du CTPS par le GEVES dès l'inscription des variétés.**

tantes à ce virus, alors que 85 à 90 % tolèrent le WSSMV.

Enjeu économique important, la résistance des variétés de blé à la mosaïque est évaluée dans le cadre du CTPS (Comité tech-

nique permanent de la sélection) par le GEVES dès l'inscription des variétés. ARVALIS-Institut

1

## Attention aux différences d'échantillonnage

Si certaines des différences de résultats obtenus avec les méthodes ELISA et PCR sont dues aux caractéristiques intrinsèques de ces techniques, il faut néanmoins tenir compte de la variabilité liée aux échantillons. En effet les tests réalisés par les laboratoires n'ont pas été effectués sur un échantillon unique. L'étude a montré que les détections réalisées sur des échantillons différents issus d'une même parcelle pouvaient donner des résultats dissemblables, de l'ordre de 15 % sur cette étude. La présence du virus et de son champignon vecteur n'étant pas homogène dans le sol, toutes les plantes ne sont pas infectées. Pour cette raison, dans le cadre d'un diagnostic, il est préférable d'échantillonner les plantes exprimant des symptômes afin de réaliser les analyses.

du végétal évalue également cette résistance en post-inscription. Les deux instituts étudient la résistance au champ sur des sites où les virus sont présents. Parallèlement à cette évaluation agronomique (observation des symptômes), les instituts s'appuient sur des analyses de laboratoire. L'objectif est double : confirmer la présence des virus de mosaïque et écarter la possibilité que les symptômes observés aient d'autres causes, comme des carences par exemple.

## Des réactions croisées avec ELISA

Actuellement, les tests utilisés sont basés sur la technique ELISA et permettent d'obtenir des résultats fiables. La méthode a cependant un niveau de sensibilité limité par rapport à des techniques plus récentes. Par ailleurs, sa mise en

La mosaïque des stries en fuseau sur blé dur s'est fortement développée dans les quatre régions de production que sont le Centre, le Poitou-Charentes, le Sud-Ouest et le Sud-Est.

œuvre nécessite l'utilisation de sérums, produits dont les performances fluctuent en fonction du fournisseur et peuvent être altérées au cours du temps. Enfin, des réactions croisées entre les réactifs et les deux virus ont été observées, remettant parfois en cause la fiabilité de ces tests. L'identification des virus via une méthode plus récente dite PCR (Polymerase chain reaction) pourrait palier à ces problèmes. Fondée sur la détection de séquences spécifiques du génome du virus, la PCR a, entre autre, 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 et l'INRA ont mené une étude de comparaison de ces deux méthodes, afin d'en évaluer les performances.

## Une centaine d'échantillons testés

Les instituts ont travaillé sur une centaine d'échantillons de variétés de blé récoltés en 2010 et 2011 ainsi que sur quatre témoins (Aztec, Cézanne, Trémie et Virlor) dont le niveau de résistance est connu. Les blés provenaient de quatre sites de contamination bien caractérisés par le GEVES et ARVALIS-Institut du végétal, situés à Oizon et Marmagne (Cher), Chambon et Pray (Loir-et-Cher). Le bymovirus est présent sur les deux derniers sites et suspecté à Oizon. Le furovirus est détecté à Chambon, Marmagne et Oizon.

Chaque variété a dans un premier temps été évaluée visuellement selon une échelle de notation allant de 0 à 5 (1). Pour chacune,



© ARVALIS-Institut du végétal

dix talles ont ensuite été prélevés au stade tallage puis 30 jours après. Des témoins sains, cultivés sous serre, ont été utilisés en tant que témoins négatifs. Les prélèvements ont enfin été expédiés aux laboratoires chargés des tests ELISA (2) et des marquages par PCR (3).

### Des détections précoces possibles

Quelle que soit la technique utilisée, premier résultat : aucun virus n'a été détecté sur les témoins sains (témoins négatifs). Ce qui a permis de valider la pertinence de la méthode PCR et de confirmer celle de l'ELISA. Sur le site de Pray, le furovirus n'a pas été détecté dans les variétés sensibles telles que Cézanne et Aztec, ce qui confirme l'absence de

**PCR et ELISA : des réponses identiques**

	Sensibilité connue*	Chambon			Oizon			Pray		
		PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note	PCR	ELISA	Note
Aztec	S R	+ -	+ -	2	+ -	+ -	3	- -	- -	0
Cézanne	S S	+ +	+ +	3	+ +	+ +	3	- +	- +	3
Trémie	R R	- -	- -	0	- -	- -	0	- -	- -	0
Virlor	R S	- +	- +	3	- +	- +	4	- +	- +	4

En bleu : les résultats pour le furovirus. En rouge : ceux pour le bymovirus  
 Tableau 1 : Identification par PCR et ELISA des virus (+ : présence ; - : absence) et notation visuelle des quatre variétés de blé témoins.  
 \*S : sensible ; R : résistant

ce virus sur le site. Second point, les analyses ont permis de détecter les deux virus dès le tallage, alors que la plantule est encore dans un stade précoce de son développement. Troisième élément important, les réponses apportées en ELISA et

en PCR se sont montrées à la fois comparables et en adéquation avec la sensibilité connue des variétés (tableau 1). Elles se sont avérées bien correspondre aux notes visuelles, la corrélation étant comprise entre 83 et 100 % (tableau 2).



© M. Cornec

### Champ et laboratoire : des corrélations supérieures à 80 %

Méthode	Laboratoire	Prélèvement précoce	Prélèvement tardif	
ELISA	Snes	92,3 %	87 %	95,1 % *
	Galys	100 %	84 %	96,6 % *
PCR agarose	BioGEVES	97,80 %	100 %	
PCR capillaire	ARVALIS	83,70 %	95,60 %	

Tableau 2 : Evaluation du pourcentage de concordance entre la notation des symptômes et la détection réalisée par l'ELISA ou la PCR. \* : corrélations incluant les échantillons déclarés douteux par l'ELISA.

### Un jeu de données important

Cette collaboration a permis de générer un jeu de données conséquent sur plus de 130 échantillons avec les deux méthodes. Cette base est maintenant disponible pour être évaluée par les experts des organismes officiels de l'intérêt de ces méthodes pour l'évaluation des variétés pour le CTPS mais aussi afin d'identifier les laboratoires qui pourraient réaliser ces analyses en prestation de service.

2

La moindre capacité de la technique ELISA à diagnostiquer la présence du virus à un stade tardif est à noter. Elle est probablement liée à la moindre sensibilité de cette technique associée à une concentration en virus plus faible dans les plantes lors du second prélèvement. En ce qui concerne les tests PCR, la corrélation est meilleure avec la méthode de révélation par agarose qu'avec celle reposant sur l'électrophorèse capillaire. Capable de détecter des quantités de particules virales moindres, cette dernière permet d'identifier la présence de virus même à de très faibles concentrations, alors que sa présence n'a pas d'impact sur la sensibilité variétale.

La technique PCR coûte plus cher que la méthode ELISA mais son niveau de sensibilité est supérieur.

3

### Des symptômes assez caractéristiques

Les blés atteints par un 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 VMC, un nanisme est aussi observable courant montaison.

### La PCR aujourd'hui plus coûteuse

En termes de coût, et dans le cadre d'une évaluation CTPS, l'analyse d'un échantillon pour la détection des deux virus en ELISA revient à 8,45 €. En PCR, le coût s'élève à 39,15 €. La technique ELISA se révèle donc plus attractive mais présente un niveau de sensibilité inférieur à la PCR. D'autre part, des améliorations du protocole PCR sont encore possibles afin de diminuer significativement les coûts.

Si l'investissement en termes d'instruments d'analyse n'est toutefois pas à négliger, les bonnes performances obtenues avec la PCR pourraient être mises à profit pour développer une méthode de quantification des virus présents dans la plante avant même l'apparition des symptômes. Ceci pourrait également permettre d'identifier différents types de résistance des variétés face à l'attaque des virus : très peu d'informations sont aujourd'hui disponibles concernant les mécanismes de résistance impliqués, notamment pour le bymovirus.

## Les réponses apportées en ELISA et en PCR se sont montrées à la fois comparables et en adéquation avec la sensibilité connue des variétés.

Ces travaux ont en tout cas permis de montrer que la PCR permettait de détecter efficacement les virus responsables des mosaïques du blé. Les organismes officiels disposent donc maintenant de deux outils performants de diagnostic. Actuellement, l'étude se poursuit afin d'évaluer les potentialités d'une méthode PCR simplifiée permettant d'abaisser les coûts tout en conservant une sensibilité supérieure à l'ELISA. ■

(1) 0 = absence de symptôme, 1 = doute, 2 = légers symptômes, 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 (développement de la parcelle affectée).

(2) La SMES (Station nationale d'essai des semences) pour les tests officiels du CTPS et comme prestataire de service Galys à Blois

(3) BioGEVES en PCR Agarose, ARVALIS-Institut du végétal en PCR capillaire

**Delphine Hourcade,**  
d.hourcade@arvalisinstitutduvegetal.fr

**Michel Bonnefoy,**  
m.bonnefoy@arvalisinstitutduvegetal.fr

**Sophie Guillier**  
ARVALIS-Institut du végétal

4

## ELISA et PCR : des principes très différents

• **La méthode ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) est une méthode immunoenzymatique basée sur la réaction entre un antigène (protéines spécifiques présentes à la surface du virus) et un anticorps spécifique couplé à une enzyme. Ces solutions d'anticorps ou sérum sont produits et distribués par des fournisseurs spécifiques. Le virus présent dans l'échantillon fixe les anticorps et l'enzyme provoque une coloration jaune dont l'intensité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

• **La méthode PCR** (Polymerase chain reaction) est une méthode de biologie moléculaire basée sur l'amplification de l'ADN ou ARN, molécule portant l'information génétique de tout être vivant. Elle permet la détection par amplification, migration et visualisation de séquences spécifiques du virus.

**Valérie Cadot,**  
valerie.cadot@GEVES.fr  
**Audrey Delaunay,**  
audrey.delaunay@GEVES.fr

**Sophie Perrot,**  
sophie.perrot@GEVES.fr  
**Mathieu Rolland,**  
mathieu.rolland@GEVES.fr

**GEVES**  
**Véronique Viader,**  
viader@supagro.inra.fr  
**INRA**