

Phénotypages de la résistance du blé dur au *Wheat Spindle Streak Mosaic Virus*

Véronique Viader¹, Yan Holtz², Sylvain Santoni³, Véronique Marie - Jeanne⁴,
Jacques David⁵

Résumé. Nous avons pu développer ou adapter différentes méthodologies de quantification du *Wheat Spindle Streak Mosaic Virus* afin de disposer avec nos partenaires et collaborateurs, ARVALIS Institut du végétal⁶ et le GEVES⁷, d'outils de phénotypage de la résistance du blé dur *Triticum turgidum durum* au *Wheat Spindle Streak Mosaic Virus* (WSSMV). Ce phénotypage consiste à quantifier le virus dans les plantes exposées à l'infection au champ, afin d'identifier les géotypes résistants, c'est-à-dire ceux dont les feuilles ont une charge virale faible ou nulle. Ces éléments contribuent à la création de variétés résistantes, seul moyen de lutte contre l'extension de cette mosaïque transmise par un vecteur du sol *Polymyxa graminis* qui compromet à court terme la culture du blé dur et l'approvisionnement des filières qui en dépendent. Nous présentons ici et comparons trois méthodes de phénotypage de la résistance du blé dur au WSSMV : DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay), PCR (polymerase chain reaction) et qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Ces méthodes quantifient la charge virale avec des seuils de sensibilité et des contraintes différentes concernant l'état et la conservation du matériel prélevé, le coût et l'appareillage requis, le maniement d'effectifs de l'ordre de plusieurs centaines d'individus. Les évaluations ELISA et PCR sont rapprochées des notations visuelles pratiquées sur le terrain. L'exposé est illustré par des exemples de résultats des traitements par le logiciel R des données de densités optiques obtenues en ELISA et des nombres de copies virales obtenus en PCR quantitative. Ces résultats de phénotypage sont actuellement utilisés pour la recherche des régions génomiques de la plante susceptibles d'intervenir dans la résistance (QTLs (quantitative trait loci) de résistance).

Mots clés : *Triticum turgidum durum*, WSSMV, ELISA, PCR, qPCR, phénotypage de la résistance

Introduction

Le blé dur *Triticum turgidum durum* diffère du blé tendre *Triticum aestivum*, par ses génomes A et B vs A, B, D pour *T. aestivum*. Au niveau agronomique, le blé dur et le blé tendre diffèrent par leurs aires de culture, par les surfaces cultivées (pour 2014 en France, un peu moins de 0,3 10⁶ ha pour le blé dur vs 5,0 10⁶ ha pour le blé tendre) ainsi que par les moyens de recherche dédiés à chacun d'eux. Le blé dur est emblématique du bassin méditerranéen et à la base de la fabrication de pâtes de qualité, de semoule, et de boulghour. Les variétés cultivées de blé dur inscrites au catalogue ne permettent pas de limiter l'extension de la mosaïque des stries en fuseau du blé dont l'agent est le *Wheat Spindle Streak Mosaic Virus* (WSSMV), *Bymovirus* dont le génome est constitué de deux molécules d'ARN (acide ribonucléique) simple brin, positif. Sans le développement de variétés résistantes, les parcelles sont progressivement perdues pour la culture du blé dur. En effet les parcelles infectées

¹ INRA, UMR AGAP, F -34000 Montpellier, France ; veronique.viader@supagro.inra.fr

² SupAgro, UMR AGAP, F -34000 Montpellier, France

³ INRA, UMR AGAP, F -34000 Montpellier, France

⁴ INRA, UMR BGPI TA A-54/K, F -34398 Montpellier, France

⁵ SupAgro, UMR AGAP, F -34000 Montpellier, France

⁶ ARVALIS - Institut du végétal, F -75016 Paris, France

⁷ GEVES - Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences, F -49071 Beaucouzé, France

ne peuvent recouvrer un état sain du fait de la biologie du vecteur du virus, *Polymyxa graminis*, Plasmodiophoridée inféodé aux racines de blé et d'autres graminées. Ce risque a été signalé de longue date par Michel Bonnefoy, ingénieur régional d'ARVALIS, qui met à disposition des semenciers, du GEVES et des chercheurs européens, son expertise et une parcelle située à Pray (41), infectée par le WSSMV et emblavée annuellement. Jacques David, Professeur de génétique à Montpellier SupAgro, a pu ainsi tester dès 2006, sur cette parcelle, différentes ressources génétiques apparentées au blé dur. Cette collaboration a permis l'identification de nouvelles sources de résistance telle une accession d'amidonnié cultivé, *Triticum turgidum dicoccum*. Des croisements ont été réalisés et des lignées recombinantes produites, afin d'étudier l'architecture génétique de cette résistance. Un financement CTPS⁸ (C09-2009 AMS⁹) du GEVES puis un projet fédérateur Montpellier SupAgro, INRA-ARVALIS (TRAM: Transfert des résistances aux mosaïques) ont permis de rassembler des informations bibliographiques, d'adapter et de transférer les méthodologies des phénotypages de la résistance au laboratoire (évaluation de la charge virale des plantes par ELISA, PCR et qPCR). Nous présentons ici l'application au WSSMV de ces méthodes qui ont des contraintes et des cibles différentes, les démarches d'adaptation, de mise en œuvre, les contrôles, ainsi qu'une comparaison des phénotypages. Nous présenterons ainsi successivement notre utilisation du DAS-ELISA puis les méthodes moléculaires que nous avons employées pour réaliser le phénotypage de plusieurs centaines de lignées.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) et WSSMV

Cette robuste méthode de détection est presque cinquantenaire (revue de Lequin, 2005 ; Clark et Adams, 1976). Elle utilise des anticorps produits pour se lier spécifiquement à la capsid du virus visé. Nous avons utilisé les anticorps développés par Marie Jeanne et al., (1999) et commercialisés par la société SEDIAG¹⁰. Le principe de la méthode est de fixer les anticorps anti WSSMV dans des puits de plaque ELISA, puis de déposer le « jus » obtenu par broyage dans un tampon des échantillons et des témoins, ce qui permet la capture des virions par les anticorps. On rajoute en troisième couche, une solution d'anticorps couplés à une enzyme, la phosphatase alcaline (les anticorps couplés sont les mêmes que les anticorps de capture). La présence du virus recherché est révélée par l'ajout du substrat de l'enzyme, dont un produit de réaction est coloré et soluble. L'intensité de la coloration est indicatrice de la concentration virale dans des conditions de concentrations en virus qui se situent dans une zone linéaire de la courbe reliant la densité optique au logarithme de la concentration en virus (Cardin et al, 1984). En pratique on teste au préalable plusieurs combinaisons de dilutions de jus de plante et d'anticorps. La densité optique (DO) est mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre adapté à la lecture optique des plaques ELISA. Le coût matériel d'un test individuel ELISA dans nos conditions est de l'ordre de 5 euros.

Matériel, méthodes : étapes

La technique requiert différentes étapes de traitement des feuilles fraîchement collectées ou congelées à -80°C et des étapes de dépôts sur plaque : (1) *coating* (fixation des anticorps sur la plaque), (2) dépôt des dilutions de jus frais de plantes (dilution 1 : 0,4g de tissus végétaux broyés dans 4 mL de tampon, puis centrifugation : 5 min, 5000 g, à 5°C ; dilution 2 : surnageant de la centrifugation précédente dilué d'un facteur 2 à 4). (3) Dépôt du conjugué, (4) dépôt du substrat, (5) lecture de la densité optique à 405nm. Les volumes déposés sont de 100 µL par puits. Les trois premières étapes (1), (2) et (3) peuvent être réalisées indifféremment 15 h à 6°C ou 3 h à 37°C, dans une étuve. Chaque étape est suivie de trois rinçages au PBS-Tween. La technique appliquée à un grand nombre d'échantillons requiert des consommables et matériels spécifiques : plaques à fond plat

⁸ CTPS – Comité technique permanent de la sélection des plantes cultivées, F-49071 Beaucouzé, France

⁹ AMS – Agriculteurs multiplicateurs des semences, représentés par la Fédération nationale, FNAMS, F-75001 Paris

¹⁰ SEDIAG – Technopôle agro-environnement, F-2110 Bretenière, France

Maxisorb™(442.404 de VWR¹¹), sacs de broyage (ACC00930, Biofords¹²), dispositif de broyage (perceuse à colonne équipée d'un Homogenizer hand model 40001 (Bioreba¹³)). Le matériel non spécifique consiste en une étuve à 37°C, des congélateurs à -20°C et à -80°C, un pH mètre, un réfrigérateur, un lecteur de densité optique de plaque à 405nm, des pipettes simples et multicanaux, des pipettes de transfert (43222, Dutscher¹⁴), des plaques à puits profonds 96 puits, (34284, Dutscher) pour un travail en série et une centrifugeuse.

Les tampons employés lors des différentes phases sont (1) tampon de coating (Na₂CO₃ (0,015M) soit 1,59 g/L, NaHCO₃ (0,034M) soit 2,85 g/L, eau miliQ qsp 1 L, pH ajusté à 9,6, (2) tampon de rinçage (PBS (phosphate buffered saline): NaCl (137mM) soit 8 g/L, KCl (2,7mM) soit 0,2g/L, Na₂HPO₄·12H₂O (8mM) soit 2,39 g/L, KH₂PO₄ (1,47mM) soit 0,2 g/L. pH 7,4 + Tween (0,05 % v:v)), (3) tampon de broyage des échantillons (PBS-Tween-PVP: PBS + 2% m:v PVP + 0,05% v:vTween), (4) tampon pour le conjugué (PBS-Tween-PVP + 0,2% m:v de Chicken albumine (A5503, Sigma¹⁵)), (5) tampon de dissolution du substrat (diéthanol amine ((D8885, Sigma) à 97: 1000 v:v (eau), pH ajusté à 9,8; (6) substrat de l'enzyme liée au conjugué : para nitro phényl phosphate, pNPP (ACC00404, Biofords). Le respect de la composition exacte et du pH du PBS est important (PBS, réf. D6773, Sigma). Le protocole du DAS-ELISA est issu de l'UMR BGPI¹⁶. Il est également donné par le fournisseur des anticorps anti WSSMV utilisés, SEDIAG.

Comme tampon de broyage des échantillons, alternativement au tampon PBS-Tween-PVP, nous avons utilisé le tampon Citrate Urée (tri sodium citrate C₆H₅Na₃O₇ (114 mM) soit 29,41g/L; urée (0.5M) soit 30,03 g/L, Tween (0,05 % v : v) pH : 7,4). Ce tampon est plus dénaturant que le PBS-Tween-PVP. Cet usage sera commenté dans la partie discussion.

Matériel, méthodes : traitement des échantillons et des plaques

Le traitement des échantillons intervient le plus tôt possible après la collecte, soit de 1 heure à 15 jours. Les échantillons collectés sont conservés entre 6°C et 15°C, en évitant leur dessiccation en les couvrant d'un linge humide. Pour chaque échantillon collecté, l'étape de conditionnement (1) consiste à préparer un « mini fagot » assemblant toutes les feuilles constituant l'échantillon puis à les sectionner avec des ciseaux pour fournir une masse de 0,4g placée dans un sac de broyage, stockée à -80°C puis gardée dans la glace lors de son utilisation. On réalise pour une plaque ELISA donnée, le relevé sur une fiche de plaque des échantillons ordonnés du premier au quarantième (2), et (3) la distribution de 4 mL de tampon de broyage par sac, suivie (4) d'un broyage. Ensuite, on réalise (5) le transfert de 1 mL de jus de chaque échantillon en plaque à puits profonds au moyen de pipette de transfert à usage unique, puis (6) une centrifugation (5 min à 5000 g et à 5°C) de la plaque à puits profonds. Ensuite, on réalise la dilution (7) par exemple au demi, du surnageant de jus dans une deuxième plaque à puits profonds et enfin (8) la distribution en duplicatas selon un plan de plaque ELISA unique. On réalise (9) un stockage à 6°C des jus non dilués de la plaque à puits profonds jusqu'à validation de la plaque ELISA, puis (10) stockage de cette plaque à puits profonds à -20°C pour contrôle ultérieur éventuel. Ces jus conservés ont servi dans nos conditions à vérifier la positivité d'un échantillon en Elisa (mais la DO baisse) et/ou à réaliser des contrôles génotypiques sur les jus (au moyen d'un protocole de capture¹⁷ d'ADN (acide désoxyribonucléique) dégradé et microsatellites. Les plaques ELISA (96 puits) sont organisées en une colonne de « blancs » qui ne

¹¹ VWR – 201 rue Carnot, F-94126 Fontenay sous-bois, France

¹² AGDIA-BIOFORDS – 5 rue Henry Desbruères, F-91030 Evry, France

¹³ BIOREBA – Christoph Merian-Ring 7, CH-4153 Reinach, Suisse

¹⁴ DUTSCHER – 30 rue de l'Industrie, F-67172 Brumath, France

¹⁵ SIGMA – L'Isle d'Abeau Chesnes, F-38297 Saint-Quentin Fallavier, France

¹⁶ INRA, UMR BGPI TA A-54/K, F -34398 Montpellier, France

¹⁷ Protocole disponible auprès de Sylvain.Santoni@supagro.inra.fr, UMR AGAP, INRA, F-34000 Montpellier, France

recevra que le substrat, une colonne dont quatre puits sont occupés par un témoin positif et quatre puits par un témoin sain. Les autres puits reçoivent en duplicatas 40 échantillons.

Matériel, méthodes : pratiques

Les précautions qui évitent les contaminations entre échantillons sont le port de gants, le passage à l'alcool des ciseaux, gants et pinces entre chaque échantillon lors du conditionnement, l'usage unique de pipettes de transfert et cônes à filtres lors des transferts des jus et de leurs dilutions.

Les éléments de traçabilité sont : (1) la préparation d'étiquettes complètement renseignées pour la collecte (date de prélèvement, croisement, lieu, parcelle, répétition, code individuel de l'échantillon ELISA (jus)) ce qui nécessite une bonne coordination avec l'équipe qui gère l'essai sur le terrain, (2) le report du code ELISA individuel sur le sac de broyage puis sur la fiche de plaque, (3) la fiche de plaque. Chaque plaque ELISA lors de sa réalisation fait l'objet d'une fiche de plaque indiquant un numéro de plaque, l'opérateur, le virus recherché, ainsi que les dates, durées et conditions de température des différentes étapes du test, la liste des codes des échantillons avec leurs 40 positions et la date de broyage ainsi que les dilutions utilisées pour les jus de plante et les anticorps.

Chaque campagne de phénotypage ELISA est précédée de tests préliminaires qui déterminent la composition du mélange qui sera aliquoté en sachets pour constituer les témoins positifs. Cette composition est réalisée en testant des témoins sensibles issus d'une collecte en parcelles contaminées. Ces tests préliminaires comparent également différentes dilutions d'échantillons et d'anticorps pour établir celles qui maximisent l'homogénéité de la mesure de DO intra individu et l'écart entre les individus sains et contaminés. La composition de chaque échantillon collecté et son conditionnement pour constituer l'échantillon broyé prennent en compte l'absence de connaissance de la répartition virale intra plante et intra parcelle, la présomption de sa variabilité inter années et inter génotypes.

Matériel et méthodes : traitement des données

Les DO brutes des échantillons, lues par le spectrophotomètre lecteur de plaque, sont rassemblées dans un tableau qui collecte les numéros de plaques, les valeurs des blancs, des témoins positifs et témoins négatifs et les codes échantillon. Une étape de validation de chaque plaque comporte les phases d'évaluation : (1) des blancs (DO basses et peu variables intra plaque, inter puits), (2) des témoins négatifs (DO supérieures aux blancs, de l'ordre des DO les plus basses des échantillons de la plaque), (3) des témoins positifs : DO élevées, au moins supérieures à trois fois celle des témoins négatifs (4) des répétitions de chaque échantillon testé : coefficient de variation inférieur à 10% entre les deux puits de mesure du même échantillon. Un script R¹⁸ automatise la démarche.

Les données extraites sont, par plaque à valider, les moyennes, le minimum et le maximum des DO brutes, pour chaque catégorie de puits (blancs, témoins positifs et témoins négatifs, échantillons). On calcule les rapports des DO moyennes des échantillons aux DO moyennes des témoins négatifs et positifs (la moyenne des DO des blancs de la plaque étant ôtée de chacune de ces DO). Ces valeurs représentatives de chaque plaque sont représentées en boîtes à moustaches¹⁹. On retient les données simples et celles obtenues par calculs (exemple $\log(\text{DO moyenne échantillon} / \text{DO moyenne témoin sain})$ qui permettent l'alignement des médianes des plaques.

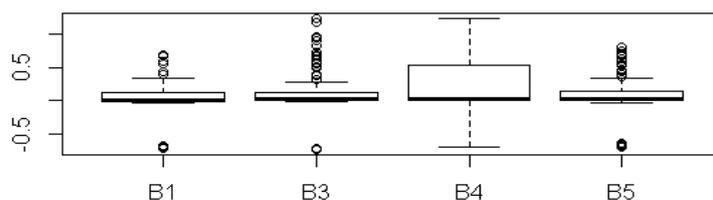
¹⁸ <https://www.r-project.org/>

¹⁹ <https://fr.wikipedia.org/wiki/Boîte-à-moustaches>

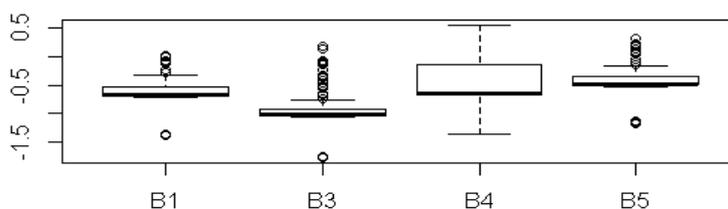
L'ensemble des traitements des informations de DO du lecteur de plaque et de fiche de plaque est réalisé avec le logiciel R. Ces données sont par la suite rapprochées des données génétiques et de terrain.

Résultats - exemple 1 : comparaisons inter plaques

Comparaison par une représentation en boîte à moustaches de deux normalisations des DO issues d'une étude réalisée sur une parcelle agricole fréquemment inondée et plantée en blé dur, située vers Quissac (30), en 2012. La parcelle de l'étude présentant de larges tâches jaunes a été repérée. Des prélèvements ont été testés qui ont montré une forte contamination par le WSSMV associé à un autre virus transmis également par *Polymyxa graminis*, le *Soil Borne Cereal Mosaic Virus* (SBCMV), agent de la mosaïque du blé. L'agriculteur a été identifié, démarché, une convention établie et un essai implanté. L'essai comportait la descendance d'un croisement et, par ailleurs, des « témoins champ » - cultivars de sensibilité connue au WSSMV et au SBCMV (blés durs : 'Pescadou' (sensible au WSSMV et SBCMV), 'Aronde' (sensible au WSSMV et résistant au SBCMV) et 'Soldur' (partiellement résistant au WSSMV et sensible au SBCMV) ; amidonnier : accession Dic2 (résistant au WSSMV); orge (résistant aux deux virus)). La résistance au WSSMV du blé dur n'est pas une immunité. Le champ d'essai fut fortement inondé et enherbé, cependant quelques mesures ont pu être réalisées.



1a.



1b.

Figure 1. Boîte à moustaches de deux normalisations des DO de quatre plaques ELISA B1, B3, B4 et B5 : 1a : $\log(\text{DO moyenne d'un échantillon}/\text{DO moyenne du témoin sain})$ et 1b: $\log(\text{DO moyenne d'un échantillon}/\text{DO moyenne du témoin positif})$. La moyenne des DO des blancs de chaque plaque est enlevée à toutes les DO des échantillons et des témoins.

La normalisation retenue est le log du rapport des moyennes des DO au témoin sain (**Figure 1a**) car elle aligne les médianes des plaques. En effet, les descendants dont il faut déterminer la charge virale sont trop nombreux pour passer sur une seule plaque, or il existe des différences entre les plaques dues pour une part aux différences de lots d'échantillons testés sur la plaque (ces lots sont constitués au hasard). Pour une autre part la variation est liée intrinsèquement aux conditions de réalisation de la plaque, elle est en partie artéfactuelle et nous cherchons à la minimiser au laboratoire. Il convient de la traiter mathématiquement, c'est le but de la normalisation.

Résultats - exemple 2 : visualisation des DO normalisées pour les différentes catégories d'échantillons pour contrôle rapide

Représentations graphiques des données issues de l'étude présentée dans l'exemple 1 ci-dessus :

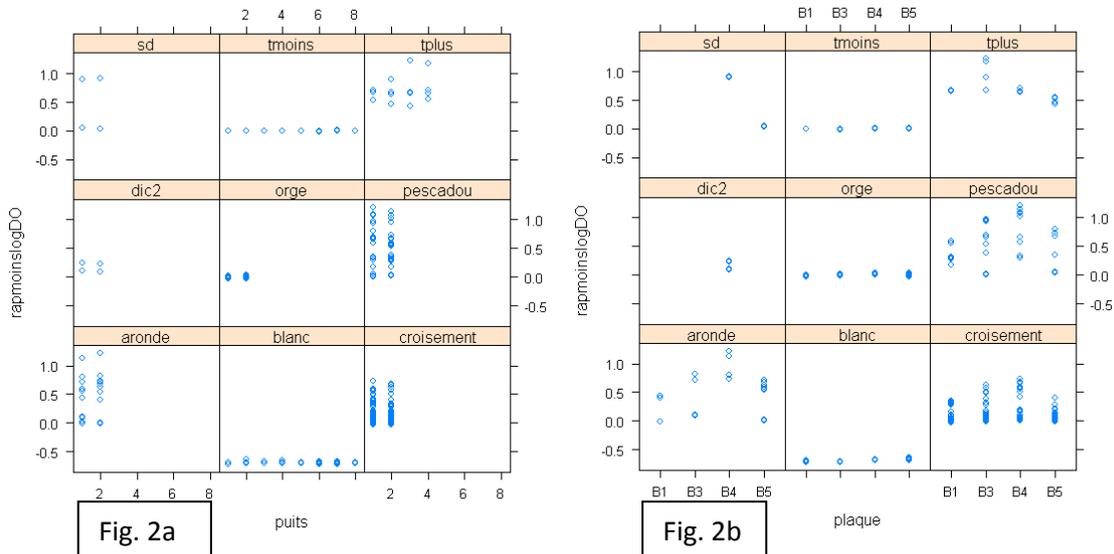


Figure 2. Représentation des DO normalisées pour différentes catégories d'échantillons et de témoins.

Figure 2a. En ordonnées figurent les DO normalisées ($\log(\text{DO moyenne de l'échantillon}/\text{DO moyenne du témoin négatif de plaque})$) des différentes catégories de témoins ELISA (« t plus », « t moins », « blanc ») ou d'échantillons et témoins de champ répétés dans l'implantation de l'essai (« sd » pour 'Soldur', « aronde », « dic2 », « pescadou », « orge », « croisement »). En abscisses figurent les numéros de **puits**. Chaque point bleu figure une valeur de DO normalisée pour un échantillon ELISA et un puits donné, toutes plaques confondues.

Figure 2b. En ordonnées figurent les DO normalisées ($\log(\text{DO moyenne de l'échantillon}/\text{DO moyenne du témoin négatif de plaque})$) des différentes catégories de témoins ELISA (« t plus », « t moins », « blanc ») ou d'échantillons et témoins de champ répétés dans l'implantation de l'essai (« sd » pour 'Soldur', « aronde », « dic2 », « pescadou », « orge », « croisement »). En abscisses figurent les numéros de **plaque**. Chaque point bleu figure une valeur de DO moyenne (entre les DO des deux puits ELISA du même échantillon) normalisée pour une catégorie d'échantillon par plaque (B1, B3, B4 et B5).

Le graphique permet ainsi un **contrôle visuel global** de la gamme de répartition des DO d'une catégorie d'échantillon et de témoins (**Figure 2a**). Sur la **Figure 2b**, on peut visualiser la gamme de variations des DO normalisées entre les plaques. L'orge, le témoin sain et un parent résistant présentent des DO normalisées nulles, voisines de celle du témoin sain c'est-à-dire dont le rapport au témoin sain est proche de 1 ($\log(1)=0$). Les « pescadou » sont des témoins champ sensibles implantés puis prélevés sur la longueur de l'essai, les variations de DO de ces échantillons mettent en évidence une concentration virale variable qui indique une répartition non homogène du virus sur la parcelle. On peut voir aussi sur la **Figure 2a** qu'il y a un problème pour les échantillons témoins de champ nommés « sd » (pour « Soldur ») que l'on attend résistants. L'échantillon « sd » de DO proche de 10 fois le témoin sain ($\log(10)=1$) a été mal collecté ou mal identifié. **On repère ainsi facilement les valeurs aberrantes** et on peut effectuer les vérifications nécessaires.

L'« effet plaque » enlève de la précision à la quantification de l'infection virale. Il est souhaitable de minimiser les écarts entre les moyennes des plaques. *A priori* cette variation est liée soit à la plaque elle-même et à l'ensemble des traitements qu'elle a subis soit aux charges virales différentes des 40 échantillons qu'elle reçoit. Ainsi, si l'on observe la case correspondant à la catégorie « croisement », en bas et à droite des **Figures 2a** et **2b**, on voit que

les logarithmes de rapport de DO des échantillons aux DO des témoins négatifs sont compris entre 0 (soit un rapport de DO de 1) à environ 1 (soit un rapport de DO de 10). Cette amplitude entre les points hauts et les points bas se retrouvent équivalente pour les puits 1 ou les puits 2 de l'ensemble des plaques. Par contre, l'amplitude diffère entre les plaques B1, B3, B4 et B5. La **Figure 1b** nous permet de vérifier que cette variation entre les plaques n'est pas due aux témoins négatifs de plaque (« moins »), ni aux blancs dont la valeur et les variations sont faibles. Les catégories d'échantillons dont les DO sont plus fortes et plus variables montrent toutes que les DO de la plaque B4 sont élevées et celles de B1 et B5 basses. Cet exemple montre également l'intérêt **d'une répartition au hasard sur les plaques de l'ensemble des échantillons collectés** au champ qui ne peuvent être traités tous sur une seule plaque. En effet, un test de croisement comporte 200 individus à tester en deux répétitions et plusieurs lieux soit des tests ELISA sur environ 20 plaques.

Méthodes moléculaires : traitement des échantillons, extractions d'ARN, contrôle de qualités et quantités des ARN, reverse transcription, PCR et PCR quantitative

La polymerase chain reaction (PCR) «en point final» et la PCR quantitative (qPCR) ont moins de 30 ans, elles ont pour cible l'ADN. Le diagnostic par PCR (en point final ou par PCR quantitative) du WSSMV repose sur un processus comportant une extraction d'ARN, sa reverse transcription en cDNA, un choix d'amorces spécifiques complémentaires d'un fragment de la séquence virale et des conditions permettant d'obtenir une amplification du cDNA. L'amplification est suivie par fluorescence dans la qPCR et les produits obtenus par PCR simple sont visualisés sur gel d'agarose grâce au bromure d'éthidium ou sur un électrophorégramme de séquenceur (PCR avec amorces fluorescentes).

Traitement des échantillons pour les méthodes moléculaires : conditionnement, stockage, broyage

Les feuilles collectées sont mises à sécher à température du laboratoire. Les feuilles regroupées sont représentées par une masse qui dans un premier temps a été de 10 à 20 mg de tissu sec (équivalent à environ 50 à 100 mg de tissu frais), compatible avec le kit d'extraction d'ARN. Les échantillons de fragments de feuilles sèches de 10 mg sont broyés en tubes eppendorf de 2mL à fond rond avec du sable et une bille de porcelaine sur un broyeur «Tissuelyser» (Qiagen), en répétant des séquences d'une minute à 20Hz.

La représentativité de la masse extraite a été par la suite augmentée et rapprochée de celle de l'ELISA en pesant 0,2 g de tissus secs (équivalent à environ 1 g de frais). Les échantillons de 0,2 g sont broyés en tubes de 13 mL avec 10 billes biconiques d'acier, sur broyeur (Geno/Grinder 2010) par séquences de 6 min à 950 rpm, jusqu'à obtention d'une poudre fine contrôlée visuellement. Les poudres obtenues en tubes de 13 mL sont conservées à 15-25°C. Après broyage 10 mg de poudre sont prélevés pour extraction à l'aide de kit.

Extraction d'ARN : comparaison des kits Spectrum™ de Sigma et RNeasy plant mini kit de Qiagen

Les kits RNeasy Plant mini kit extraction ((50) – ref:74904, Qiagen²⁰) et Spectrum™ plant kit extraction ((50) : ref: STRN50-1KT, Sigma) et les traitements DNase RNase free correspondants représentent un coût par échantillon de l'ordre de 6€ + 1,5 € et de 2,8 € + 1,3 € respectivement. Ils ont été utilisés en appliquant des traitements DNase sur colonne selon les modes d'emplois des fournisseurs (ref. Qiagen : 79254, ref. Sigma : DNASE70-

²⁰ QIAGEN SA, 3 avenue du Canada, F -91974 Courtabœuf, France

1Set). Une quinzaine d'échantillons conservés secs à 15-25°C, pendant deux ans, collectés en 2012 en parcelles contaminées (Pray et Chambon) et dont les DO ELISA avaient été mesurées, ont été pesés et broyés en tubes 13 mL. Les ARN d'aliquotes des poudres obtenues de chaque échantillon ont été extraits avec les deux kits, dosés et qualitativement évalués en spectrométrie UV au moyen d'un Nanodrop (Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer). Par la suite, ces ARN ont été reverse transcrits. Une PCR puis une qPCR ont été réalisées sur différentes dilutions des cDNA obtenus pour chaque couple échantillon-extraction.

Deux microlitres d'ARN élués avec 50 µL d'eau milliQ (Sigma) et 80 µL pour (Qiagen), dilués deux fois sont évalués au Nanodrop. Les données obtenues consistent en des absorbances et des rapports d'absorbance dont la moyenne pour 15 échantillons extraits avec le kit Sigma et avec le kit RNeasy sont comparés graphiquement au moyen de boîtes à moustaches sur la **Figure 3**.

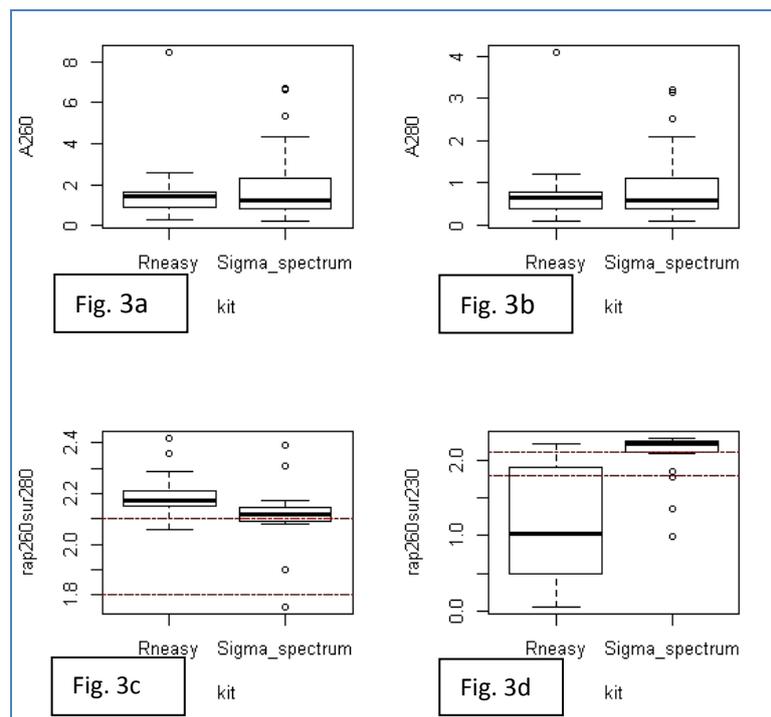


Figure 3. Représentation en boîte à moustaches des différentes absorptions UV et de leurs rapports donnés par le Nanodrop et utilisés couramment pour évaluer les qualités et quantités d'ARN extraits avec les kits RNeasy et Sigma Spectrum.

Figure 3a. Boîte à moustaches de l'absorption à 260nm (A260) des ARN des échantillons extraits avec le kit Rneasy à gauche et le kit Sigma Spectrum, à droite. A260 est imputable aux bases des ARN ou des ADN; elle est proportionnelle aux quantités d'acides nucléiques.

Figure 3b. Boîte à moustaches de l'absorption à 280 nm (A280) des ARN des échantillons extraits avec le kit Rneasy à gauche et le kit Sigma Spectrum, à droite. A280 est imputable aux acides aminés à cycle aromatique tel le tryptophane ; elle est proportionnelle aux quantités de protéines.

Figure 3c. Boîte à moustaches du rapport A260/A280 des ARN des échantillons extraits avec le kit Rneasy à gauche et le kit Sigma Spectrum, à droite. Le rapport de ces deux absorbances A260/A280 doit être dans l'intervalle (1.8 ; 2.1).

Figure 3d. Boîte à moustache de l'absorption à A260/ A230 des ARN des échantillons extraits avec le kit Rneasy à gauche et le kit Sigma Spectrum, à droite.

Ce rapport doit être proche de 2, A230 augmentant avec la pollution par divers composés organiques.

L'absorption à 260 nm (**Figure 3a**) montre des quantités comparables mais plus variables pour les ARN totaux extraits avec le kit Sigma que pour les extractions RNeasy. L'absorption à 280 nm semble comparable bien que plus variable et en médiane plus basse pour le kit Sigma Spectrum que pour le kit RNeasy. Le rapport des deux absorbances A260/A280 doit être dans l'intervalle 1,8 ; 2,1. On constate sur la représentation (**Figure 3 c**) que les ARN extraits avec le kit Sigma sont plus proches de cet optimum que ceux extraits avec le kit RNeasy. Le rapport A260/ A230 doit être proche de 2, A230 augmentant avec la pollution par divers composés organiques. La qualité des ARN extraits par le kit Sigma est également meilleure pour ce paramètre (**Figure 3d**). Les indications qualitatives données par le Nanodrop²¹ sont donc en faveur des extractions des ARN totaux par le kit Sigma.

Nécessité d'un traitement DNase

Les électrophorèses sur gel d'agarose des produits d'amplification issus de PCR réalisées avec différentes amorces complémentaires de la séquence génomique du WSSMV montrent la présence de bandes, y compris pour les PCR réalisées à partir d'ADN de blés sains traités RNase (données non présentées ici). Ces bandes apparaissent également sur des PCR réalisées à partir d'ADNc issus d'ARN extraits sans traitement DNase de blés contaminés. Elles sont imputables à de l'ADN extrait avec l'ARN. **En effet, le traitement DNase appliqué lors de l'extraction des ARN les fait disparaître.**

Les photos des gels des **Figures 4a** et **4b** ci-dessous permettent la comparaison des amplifications PCR d'échantillons et témoins dont les ARN ont été extraits sans (**Figure 4a**) ou avec (**Figure 4b**) traitement DNase-RNase free. Les échantillons sont : G (glumes d'épi sain, Dic2, Pray, 2010), PPG (pool de racines de plantes infectées en inoculation contrôlée), SIG 1 et 2, des prélèvements issus de prospection (Bram (Aude), 2010) et 311 et 302 des témoins positifs. L'échantillon PPG, riche en bandes obtenues par PCR avec toutes les amorces testées, est signalé par une flèche inclinée orange. Les tailles des fragments amplifiés sont repérées grâce à une échelle moléculaire. Les principes et méthodologies de la PCR en point final ainsi que les différentes amorces sont présentées dans la suite du paragraphe.

Figure 4 a et 4 b page suivante

²¹ http://www.biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html

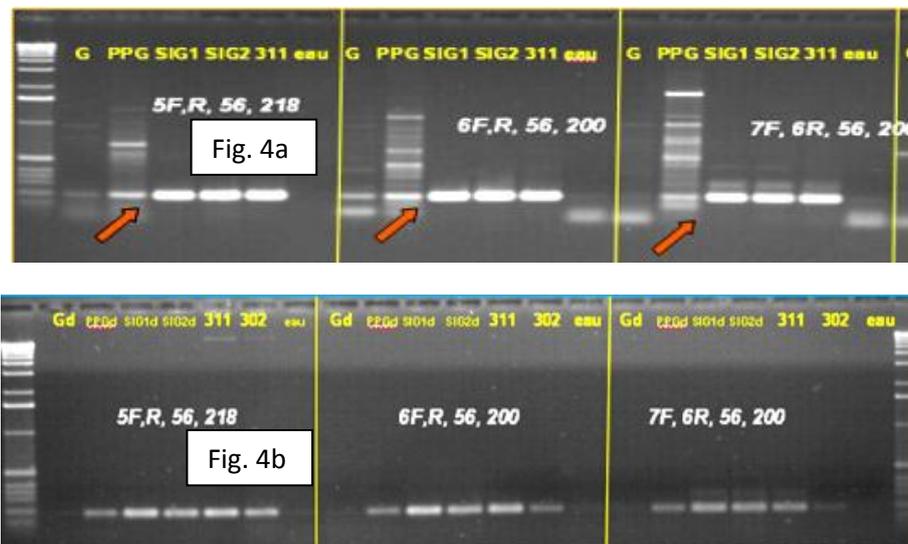


Figure 4. Photos de gels de migration des produits PCR obtenus sur des ADNc reverse transcrits à partir d'ARN extraits sans (Fig 4a) ou avec (Fig 4b) traitement DNase pour les échantillons (en jaune) G, PPG, SIG1, SIG2, 311 et eau et différentes paires d'amorces (nom des amorces,, température d'hybridation et taille du fragment amplifié notés en blanc en blanc.)

Les bandes observées dans chaque colonne résultent de la migration des produits des PCR réalisés avec différentes amorces codées sur la photographie du gel : 5, 6, 7, F (forward), R (reverse), (Tableau.1). Le premier nombre inscrit après le code de l'amorce correspond à la température d'hybridation (56°C), le deuxième nombre correspond à la taille attendue de l'amplification spécifique d'une partie du génome viral. Les noms des sept échantillons ou témoins figurent en jaune. Le profil en échelle situé à gauche de chaque gel est un marqueur de taille.

La comparaison des **Figures 4a** et **4b** montre **une disparition des bandes parasites**. Ceci est particulièrement net pour l'échantillon G non traité (**Figure 4a**) vs son aliquote traitée à la DNase : Gd (**Figure 4b**) (glumes d'épi sain) et pour l'échantillon PPG non traité (**Figure 4a**) vs PPGd, traité (**Figure 4b**) (pool de racines infectées en conditions contrôlées au laboratoire par le WSSMV).

Comparaisons des ARN des feuilles sèches, avec les ARN de germes et de feuilles de blé sains conservés à -20°C au moyen d'une puce Agilent

Un bio analyseur Agilent²² est utilisé notamment pour évaluer la qualité des ARN engagés par exemple dans des procédures coûteuses de séquençage à haut débit. Cette évaluation se base sur les ARN ribosomiques. Ceux-ci sont présents dans toutes les cellules en quantités importantes et égales car ils codent pour la grande et la petite sous unité des ribosomes (unités 18S et 25S). La présence, la forme et les tailles de leurs pics indiquent leur intégrité et leur concentration. La diminution des hauteurs de pic ou l'absence des pics attendus indiquent leur dégradation. Ils ont ainsi un rôle de standard interne (Fleige et Pfaffl, 2006; site Agilent).

Le passage au bio analyseur Agilent des ARN d'échantillons de tissus secs ELISA positifs ou négatifs en frais, comparés à des échantillons d'ARN de tissu frais (germe de blé ou feuille) montre une dégradation des ARN dans les échantillons secs. Cette disparition s'observe aussi bien dans les échantillons secs déterminés positifs

²² [www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2946-90004_Vespucchi_UG_eBook_\(NoSecPack\).pdf?&cd=2&hl=fr&ct=clnk&gl=fr](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2946-90004_Vespucchi_UG_eBook_(NoSecPack).pdf?&cd=2&hl=fr&ct=clnk&gl=fr)

ou négatifs, au WSSMV sur matériel frais. Cependant, comme nous obtenons des amplifications PCR à partir des cDNA synthétisés à partir d'ARN extraits de tissus secs, nous avons validé ce mode de conservation du matériel.

Extraction d'ARN : extraction low cost dans tampon GES

Une procédure d'extraction simplifiée a été testée, basée sur une publication (Osman, 2007). Cette extraction consiste en un chauffage à 95°C pendant 10 min de 16 µL du jus de broyage ELISA dilué dans 184 µL de tampon GES (glycine : 10 mmol (0,75 g), NaCl : 5 mmol (29,22 g), EDTA : 0,1 mmol (0,03 g), Triton : 0,5 mL, H₂O milliQ, qsp 100 mL). Cette procédure est rapide et a un coût très faible. Elle cumule les contraintes de l'ELISA (jus frais) et de la PCR (conditions conservatrices de l'ARN). Nous l'avons utilisée pour des échantillons en petits nombres issus de prospections occasionnelles, pour lesquels une réponse qualitative rapide est requise. Le coût d'une telle détection est estimé à 0,3€ d'extraction + 1,62 € de reverse transcription (kit utilisé qsp 2,5 µL au lieu de 9,5 µL avec usage normal du kit) + 3 € PCR et séquenceur ou + 9 € qPCR soit un coût total de 5 à 11 € par échantillon. Cette méthode d'extraction, complétée de la reverse transcription avec des amorces hexamériques random et de la PCR multiplexe, permet, à la différence de l'ELISA, la détection simultanée de plusieurs virus ce qui peut la rendre économiquement intéressante par rapport à celle-ci, dès lors que deux virus sont à diagnostiquer.

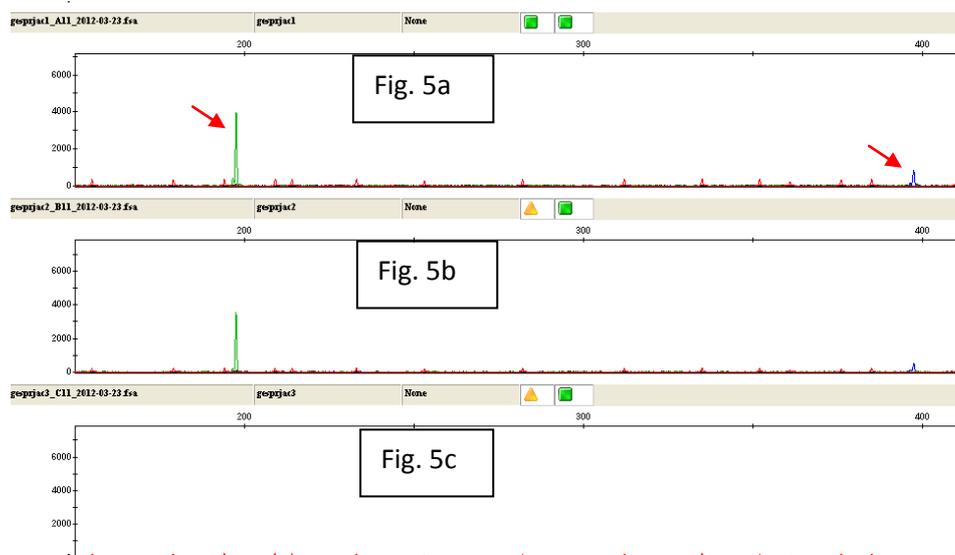


Figure 5. Electrophorogrammes sur séquenceur obtenus avec une amplification PCR utilisant des amorces fluorescentes spécifiques de WSSMV et de SBCMV²³ sur cDNA reverse transcrits à partir d'ARN extraits par la méthode GES.

En abscisse : taille des produits d'amplifications PCR, en ordonnée : intensité de fluorescence (unités arbitraires).

Figure 5a. Echantillon fortement positif au WSSMV : les flèches signalent un pic vert à 196 pb et de hauteur proche de 4000 (unités arbitraires) et un pic bleu à 400 pb de hauteur proche de 1000 correspondant au SBCMV. **Figure 5b :** Echantillon comparable à celui du profil en **Figure 5a**. En **Figure 5c :** aucun pic : échantillon négatif pour le WSSMV et le SBCMV.

²³ SBCMV co-infecte souvent les échantillons WSSMV positifs. A concentration virale égale la hauteur du pic à 196 pb serait supérieure à celle du pic à 400 pb. De plus les fluorochromes utilisés pour les amorces ont des intensités de fluorescence différentes.

On peut noter que le pic vert (WSSMV) est plus grand que le pic bleu (SBCMV) sur les échantillons testés. Ces deux virus coinfectent le blé dur en de nombreux sites. Par ailleurs, il serait plus satisfaisant de disposer d'un témoin interne ou ajouté à chaque échantillon pour différencier un échantillon négatif d'un échantillon pour lequel une des étapes (conservation, extraction, reverse transcription, PCR) n'aurait pas fonctionné.

Reverse transcription des ARN

La reverse transcription est la réaction enzymatique qui transforme les ARN en ADNc. Elle est réalisée avec le kit A3500 de Promega et ses amorces hexamériques aléatoires. Dans ces conditions tous les ARN extraits sont transcrits en ADNc. Notre légère adaptation du mode d'emploi du fournisseur aboutit au protocole suivant comportant deux étapes. Etape RT1 (linéarisation de la molécule d'ARN) : 10,5 µL d'ARN total extrait (pur ou dilué 10 fois) sont déposés sur une plaque PCR. La plaque est placée dans un thermocycleur 10 min à 70°C puis centrifugée 2 min à 2000 g et placée dans la glace 10 min. Etape RT2 (reverse transcription) : chaque puits reçoit 9,5 µL du mix de reverse transcription du kit (MgCl₂, 25 mM : 4 µL, RT Buffer : 2 µL, dNTPs mix, 10mM : 2 µL, RNasin ribonuclease inhibitor 0,5µL, RTase (15 U/µL) : 1 µL, Random Primer (0,5 µg/µL) : 1 µL. La préparation du mix de reverse transcription se fait en ajoutant les composants dans l'ordre de cette liste. La plaque est de nouveau placée dans un thermocycleur selon le programme : 10 min à 20°C, 15 min à 42°C, 5 min à 95°C, 5 min à 0-5°C, selon les préconisations du fournisseur. Le volume de ce mix peut être ajusté proportionnellement à la quantité de cDNA nécessaire. Il a été testé pour des volumes de 5 µL d'ARN (avec 5 µL de mix) ou de 2,5 µL d'ARN (avec 2,5 µL de mix) ce qui a permis d'ajuster la quantité d'ADNc produite à l'application prévue ultérieurement afin de limiter les coûts. Le coût actuel du kit de reverse transcription Promega (réf. A3500) pour 100 échantillons est proche de 500 euros. Utilisé pour produire environ 20 µL de cDNA, il revient donc à 5 euros environ par échantillon.

Activité de la reverse transcriptase (RTase) du kit : Promega recommande 15 unités de reverse transcriptase pour 1µg d'ARN. Le mix qsp 20µL total contient 1 µL de RTase soit 15 unités. Le dosage des ARN extraits des échantillons secs de l'étude de comparaisons de kit, a montré un maximum à 493 ng/µL soit une quantité dans 10,5 µL proche de 5 µg d'ARN. On a dans ce cas un rapport de 3 unités d'enzyme pour 1 µg d'ARN, au lieu des 15 requis. Il convient donc pour une étude quantitative de diluer l'ARN extrait 10 fois avant la reverse transcription. Cette dilution n'est pas utile pour l'extraction GES.

PCR en point final

La PCR nécessite des consommables et équipements courants tels que plaques, thermo scelleuse pour film adhésifs thermosoudables (couverture de plaque PCR) et thermocycleur, cuves à électrophorèse, générateur, équipement pour révélation UV et photographie des gels d'agarose. Les distances de migration des produits PCR selon leur taille peuvent être également visualisées sous forme de pics sur des électrophorégrammes de séquenceur. Dans ce dernier cas, les amorces utilisées doivent être fluorescentes. Le coût de cette détection est par échantillon de l'ordre de 5 à 11 euros. La visualisation par électrophorégramme se prête particulièrement à la détection simultanée de plusieurs virus (PCR multiplex ou multiplex post PCR). Une utilisation quantitative de la hauteur de pic est possible. Pour ce faire il convient d'utiliser des témoins étalons afin d'intégrer les différents paramètres qui modifient la hauteur du pic observé (tels le fluorochrome et la longueur du fragment) et de ne pas être en conditions saturantes.

La mise en œuvre a comporté une étape bibliographique et des tests comparatifs des amorces. Elle a entraîné une réflexion sur la position des amorces, la longueur des produits amplifiés, des optimisations de coût et de sensibilité. Les résultats ont été partiellement publiés (Hourcade et al., 2012).

Tests d'amorces

Les amorces utilisées pour la détection du WSSMV (**Tableau 1**) ont été testées en PCR simple : 94°C : 2 min, 35 x (94°C: 30 s, 56°C: 1 min, 72°C 1 min 30 s), puis 72°C : 10 min, puis 14°. (*56°C, 50°C, 58°C ou 50°C selon la température d'hybridation testée). Milieu réactionnel : ADNc non dosé dilué au 1/10e : 2 µL, Tp 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100mM, 1% Triton 100X,) : 2,5 µL ; MgCl₂ (25 mM) : 2 µL, amorce sens et amorce anti sens (100 pmol/µL = 100 µM) : 2,8 pmol, soit 0,028 µL de chaque amorce, dNTP (10mM) : 2 µL, Taq DNApol (2,5 u/µL) : 0,2 µ, H₂O miliQ, filtrée sur 0,2µm, qsp 25 µL.

Tableau 1. Présentation des amorces utilisées pour la détection du WSSMV

N° labo	Nom in bibliographie	Virus cible	N° accession pour design	Position	Région	Source	Séquence 5'-3'
5F	WSMV1F	WSSMV	consensus *	4058-4075	CP conservé	Vaianopoulos, 2006 et 2008	5'-AGCAACCCTTAGCGAAGT-3'
5R	WSMV1R	WSSMV	Comme 5F	4257-4275	CP conservé	Vaianopoulos, 2006 et 2008	5'-AGGGACGTGGAACAAAGA-3'
6F	WMVc1F	WSSMV	Comme 5F	4058-4075	CP conservé	Vaianopoulos, 2006	5'-AGCAACCCTTAGCGAAGTCA-3'
6R	WMVc1R	WSSMV	Comme 5F	4257-4277	CP conservé	Vaianopoulos, 2006 et 2008	5'-AGGGACGTGGAACAAAGAAA-3'
7F	WMVc2F	WSSMV	Comme 5F	4058-4075	CP conservé	Vaianopoulos, 2006 et 2008	5'-GCAACCCTTAGCGAAGTCAG-3'
8F	FW4	WSSMV	X73883	730-751	Nla	Gitton, 1999	5'-AAGGAAATAAATACCGCCCCAG-3'
8R	RW4	WSSMV	X73883	1165-1186	Nla	Gitton, 1999	5'-TCATACCCGACTCTCCAGCAC-3'
15F	WSSMVL1	WSSMV	X73883	4059	CP conservé	Deb, 2008	5'-GCAACCCTTAGCGAAGTCAG-3'
15R	WSSMVr1	WSSMV	X73883	4213	CP conservé	Deb, 2008	5'-GAGGCTCCGTGTCTCATAGC-3'
24F	WMVCPF	WSSMV WYMV	X73883 D 86634	3531-3552 5496-6517	CP	Clover, 1999	5'-GCTGCGGACACACAAACWGACG-3'
24R	WMVCPR	WSSMV WYMV	X73883 D 86634	4412-4390 7374-7352	CP	Clover, 1999	5'-GGTTAGCTCTGGRTGTCCATCAG-3'

* Consensus de : AJ130982, AJ130980, AB010578, AJ237525, X73883, X7383.

Positions des amorces sur la séquence virale

La séquence complète du WSSMV n'a pas été établie, à ce jour et à notre connaissance (consultation de NCBI en 2015). Son génome est composé de deux fragments d'ARN simples brins, positifs, encapsidés séparément. Les brins font respectivement environ 7 kb et 4 kb. L'organisation génomique est identique à celle du *Barley Yellow Mosaic Virus* membre type du genre *Bymovirus*. Toutes les amorces publiées sont positionnées sur l'ARN1 du WSSMV. La plus longue séquence publiée correspondant au WSSMV est celle de Sohn et al. (1994).

Tableau 2. Tailles attendues des produits d'amplification PCR avec les couples d'amorces présentées dans le **Tableau 1**

Paire d'amorces	Virus détecté	Attendu taille (pb)	Température d'hybridation bibliographie	in
5F, R	WSSMV	218	58°	
6F, R	WSSMV	200	58°	
7F, 5R	WSSMV	200	58	
8F, R	WSSMV	457	56°	
15F, R	WSSMV	154	TD* 50° - 55°	
24F, R	WSSMV/WYMV	882/879	50°	

*Touchdown : PCR qui commence avec une température d'hybridation élevée réservée aux hybridations très spécifiques des amorces, puis la température d'hybridation est abaissée progressivement.

Confection des gels : 10 μ L de produits PCR ont été déposés sur gel TAE à 1,8% d'agarose, migration à 100 volts et révélation au bromure d'éthidium (0,5 g/L).

Des exemples de gels obtenus ont été présentés en **Figure 4**. De nombreux tests ont été réalisés impliquant différentes dilutions d'ADNc reverse transcrits à partir des ARN extraits de différents témoins et échantillons.

Les amorces retenues sont celles de Vaianopoulos, 2006 et 2008 du fait notamment qu'elles génèrent un produit court soit d'environ 200 paires de bases. L'intérêt de cette petite taille est de limiter le risque de non amplification à partir d'un ADNc obtenu à partir d'ARN plus ou moins dégradé présentant des cassures (un fragment plus court présente moins de risques de comporter des cassures). Une petite taille de fragment d'amplification est également compatible avec les contraintes de la qPCR.

PCR quantitative

La méthodologie qPCR pour WSSMV a été publiée notamment par Vaianopoulos et al. en 2006 et Vaianopoulos 2008. Gitton et al., 1999 ; Clover et al., 1999, Deb et Anderson, 2008. Nous avons choisi la méthodologie Fast Syber Green où les nombres de cycles des PCR permettant d'atteindre un seuil de fluorescence (Ct) sont suivis par la fluorescence des ADN doubles brins produits. Les Ct peuvent être convertis en un nombre de copies virales au moyen d'une gamme étalon.

Confection d'un produit de gamme destiné à l'étalonnage de la qPCR

La PCR quantitative s'étalonne sur une gamme de dilutions d'un produit contenant un nombre de copies virales connu. La gamme est ici constituée de produits de PCR purifiés par capture sur des billes magnétiques. Les produits purifiés sont évalués qualitativement et dosés en spectrophotométrie UV (Nanodrop).

Les étapes pour la constitution de la gamme sont les suivantes : (1) identifier des échantillons *a priori* positifs pour le virus ciblé, (2) faire une PCR avec les amorces retenues pour la qPCR, puis un dépôt sur gel des produits pour valider les puits PCR positifs, (3) regrouper les amplifiats PCR des puits positifs, (4) relever leurs volumes. Ensuite, on purifie (5) les produits PCR (capture sur billes ADN, protocole de Sylvain Santoni, com. pers.) et on dose (6) par spectrométrie UV trois dilutions du produit purifié. Ceci permet de calculer le nombre de copies de l'ADN cible. Une dilution en cascade du produit PCR d'un facteur 10 (7) permet une validation de la gamme en qPCR. (8) : identification des dilutions-nombres de copies minimum et maximum compatibles avec la méthode, alignement des points de gamme en triplicats, position des échantillons (dilués) à passer : ils doivent être encadrés par la gamme.

L'ADNc amplifié par PCR est issu d'ARN extraits par la méthode GES à partir de sept jus ELISA conservés 24 jours à -20°C de feuilles de plants de blé en essai sur une parcelle de Quissac (30) et d'un échantillon de 'Clovis' (collecté à St Aunès (34) le 13 mars 2013). Une vérification de leur statut positif a été faite par PCR simple et les produits PCR regroupés pour un volume de 186 μ L. Le mélange a été purifié avec des billes magnétique. L'ADN est ainsi débarrassé des amorces PCR et des dNTPs, il est alors dosé dilué 1, 10 et 20 fois. La concentration a été ainsi évaluée à 210 ng/ μ L. La taille du fragment amplifié étant de 196 pb, selon une formule usuelle²⁴ (nombre de paires de bases = masse en pg \times 0.978 10^9), on peut déduire le nombre de copies par μ L de notre produit de gamme purifié, évalué ainsi à 1×10^{12} . (Il existe également des sites qui font le calcul automatiquement, par exemple : <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

²⁴ J. Dolezel, J. Bartos, H. Voglmayr et J. Greilhuber. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry, 51A:127- 128, 2003.

Cette gamme est validée de 10^8 à 10^4 copies soit des Ct respectivement d'environ 8 à 27 et qui encadrent les Ct des échantillons testés avec des cDNA dilués 10 ou 20 fois.

Conditions PCR, définition des modalités utiles

La machine qPCR utilisée est une machine Applied Biosystems StepOne Plus, elle a un logiciel dédié : StepOne. Les amorces choisies sont (5'-3') WMc1F = 5'-AGCAACCCTTAGCGAAGTCA-3' et WMVc1R = 5'-AGGGACGTGGAACAAAGAAA-3' de Vaïanopoulos, 2006 et 2008 (**Tableau 1**).

La composition du milieu réactionnel est : qsp 5 μ L de cDNA dilué 10 x, amorces WMc1F et WMVc1R à 10 pmol/ μ L (dilution 10 de la solution mère) : 0,5 μ L de chaque amorces, eau : 4 μ L, Fast SyberGreen (TF, 5 pack fast SYBR Green master mix (ref : 4385612 de applied Biosystems (AB) commercialisé sous la réf. : 10566555 par Fischer) : 10 μ L. Des consommables spécifiques sont utilisés : plaques et couvercles (TF, optical fast 96-well PLT, réf. : 4346906 de AB commercialisé sous la réf. : 10310855 par Fisher et FG, optical adhesive covers réf. : 4311971 (AB) commercialisé sous la réf. : 10299204 par Fisher).

Les conditions PCR sont : 40 cycles 95°C, 15 s, 50°C, 30 s, récupération des courbes de fusion de 50°C à 95°C par pas de 0,3°C.

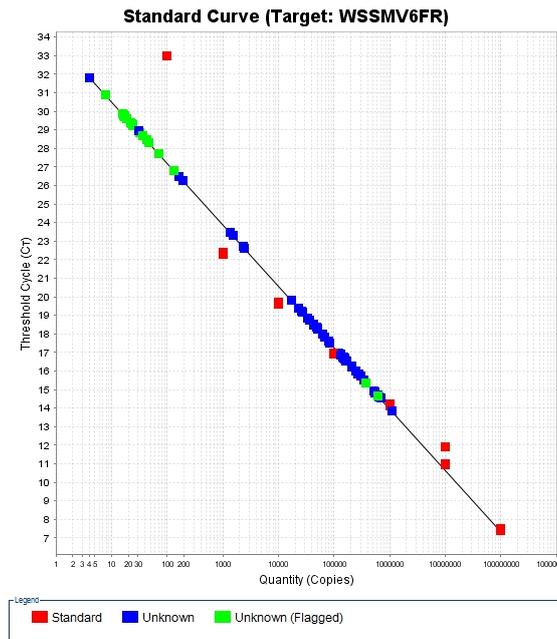
Présentation de deux essais et de leurs résultats

Position de la gamme et des échantillons

Sept points de gamme sont déposés en triplicatas, le point le plus concentré ayant 10^8 copies. Les points de la gamme sont en rouge sur la **Figure 6** qui est une sortie du logiciel Step One. Step One nous indique également que la pente est proche de -3, l'efficacité de la PCR voisine 100% et que le R^2 sans correction est de 0.939. Il est possible d'exclure des points de gamme de l'analyse, et d'affiner la relation entre les Ct des points de gamme et le nombre de copies virales des échantillons de gamme. On peut également exclure un point de répétition d'un échantillon en cas de problème identifié et relancer l'analyse. Les échantillons sont répliqués deux fois. Si leurs deux mesures présentent peu de variation, ils apparaissent en bleu, alors que le logiciel représente en vert les échantillons qui ont une variation importante de leurs mesures de Ct. Les échantillons à faibles nombres de copies virales, par exemple de plus de 25 Ct présentent fréquemment un écart entre leurs deux répétitions. Ces échantillons négatifs ont aussi souvent plusieurs inflexions de leur courbe de fusion (T_m). Le protocole est donc satisfaisant mais optimisable.

Le nombre copies virales de chaque échantillon est l'abscisse de la projection de son Ct sur la droite – gamme.

Figure 6 page suivante



slope:-3.308 Y-Intercept:33.838 R²:0.939 Eff%:100.568

Figure 6. Graphique brut d'une expérimentation de PCR quantitative ciblant WSSMV dans nos conditions.

En abscisse : nombre de copies virales (échelle logarithmique). En ordonnées : Threshold cycle (Ct) soit nombre de cycles de PCR pour atteindre le seuil (threshold) de fluorescence choisi. Points rouges : points de gamme. Points verts et bleus : points échantillons.

Comportement en qPCR des échantillons extraits par le kit RNeasy et extraits par kit Sigma Spectrum

Les échantillons extraits pour la comparaison des kits Sigma Spectrum et RNeasy à partir d'aliquote de poudre de feuilles de prélèvements au champ ont subi une qPCR. Les dépôts sur la plaque PCR étaient en duplicatas. Ainsi trois dilutions (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6}) ont été testées soit six points pour un échantillon – poudre de feuille de départ, extrait au moyen de chaque kit. Les valeurs des Ct sont reproductibles.

On constate que les Ct de la plus grande dilution des échantillons varient selon le kit utilisé. La **Figure7** illustre le comportement observé pour tous les échantillons testés dont seul trois sont représentés sur la **Figure 7**. On peut observer que les trois points représentant les Ct en fonction du log des dilutions des ARN sont alignés lorsque les ARN ont été extraits avec le kit Sigma (ronds) alors que les points des échantillons du kit Rneasy ne le sont pas (triangles).

Figure 7 page suivante

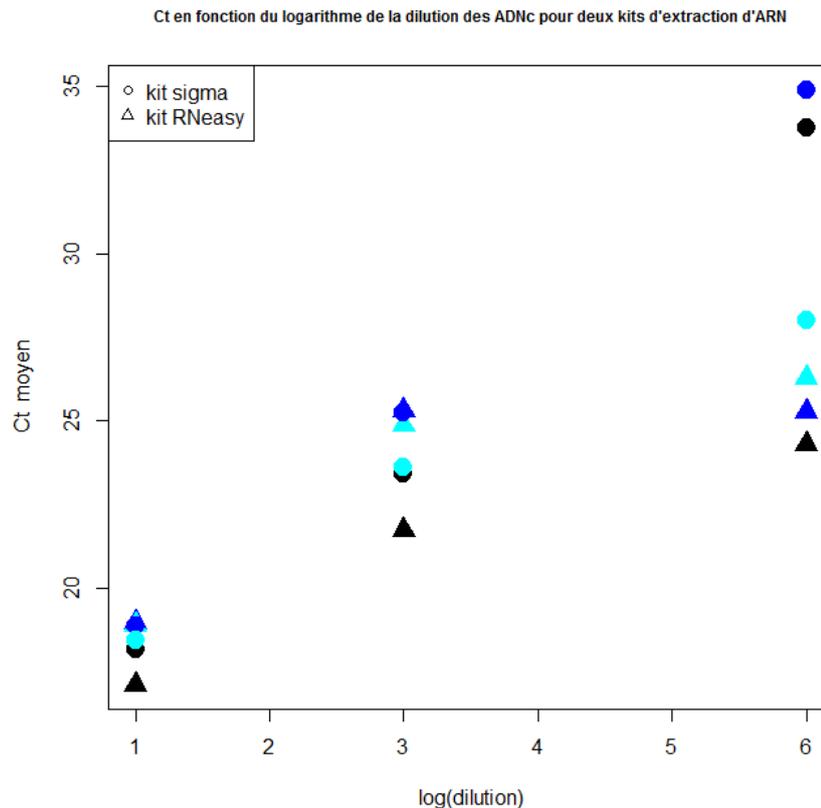


Figure 7. Comparaisons des Ct moyens obtenus lors des qPCR de trois dilutions de trois échantillons dont les ARN ont été extraits avec le kit Sigma Spectrum (ronds) et le kit RNeasy (triangles).

En abscisses : logarithme des dilutions (de cDNA) de facteurs 10, 10³ et 10⁶, (soit 1, 3, 5), en ordonnées : Ct. Chaque point est une valeur moyenne des deux répétitions des qPCR réalisées à partir des dilutions de cDNA provenant de la reverse transcription des ARN. Ces ARN furent extraits avec le kit RNeasy (triangles), et avec le kit Sigma spectrum (ronds) à partir d'aliquotes de la même poudre de feuilles séchées représentant une plante. Un rond et un triangle de la même couleur correspondent au même échantillon de poudre de départ.

Boîte à outils des phénotypes de la résistance au WSSMV

Nous avons présenté les différents protocoles de quantification du WSSMV applicables à des séries d'échantillons compatibles avec la recherche de QTL de résistance. Ces différents protocoles, leurs contraintes et leurs coûts sont regroupés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 page suivante

Tableau 3. Caractéristiques des différentes étapes utilisées au cours des phénotypes présentés

Méthode	Matériel de départ	Produit de la réaction	Etape de quantification	Coût	Optimum pratique
ELISA	tissus frais	virus capturé en sandwich entre deux molécules d'anticorps	DO échantillons et témoins Méthode semi quantitative, normalisable	5	40 (une plaque complète)
ELISA	conditionnés et à -80°C	virus capturé et en sandwich d'anticorps	DO échantillons et témoins Méthode semi quantitative, normalisable	5	40 (une plaque complète)
ELISA	conditionnés et à -20°C	virus capturé et en sandwich d'anticorps	DO échantillons et témoins Méthode semi quantitative, normalisable	5	40 (une plaque complète)
Extraction d'ARN low cost	jus ELISA frais ou congelé	ARN	Quantification de l'ARN total extrait au nano drop	0,3	92 + 4 témoins (une plaque PCR complète)
Extraction d'ARN (kit)	tissus secs	ARN	Quantification de l'ARN total extrait au nano drop	4	12 (centrifugeuse de paillasse)
	tissus lyophilisés	ARN	Quantification de l'ARN total extrait au nano drop	4	12
	tissus congelés	ARN	Quantification de l'ARN total extrait au nano drop	4	12
Reverse transcription	ARN	ADNc	Quantification du nombre de copies par PCRq ou Nanodrop après purification	2 à 5 euros	94 + témoins (une plaque PCR complète)
PCR simple	cDNA	Amplifiat spécifique	Appréciation qualitative : présence absence de bande	3	92 + 4 témoins (une plaque PCR complète)
PCR simple amorces fluorescentes	cDNA	Amplifiat spécifique et fluorescent (amorce fluo)	Quantification relative des hauteurs de pic d'électrophorogrammes	5	92 + 4 témoins (une plaque PCR complète)
PCR quantitative	cDNA + gamme étalon	Amplifiat fluorescent (SybrGreen, double brin)	nombre de Ct, quantification de la cible	15	36 (1 plaque PCR : duplicatas et gamme et témoins)

Ce tableau montre que les différents protocoles n'ont pas les mêmes coûts et présentent chacun un optimum pratique du nombre d'échantillons manipulables. **On peut donc choisir, en fonction de la question traitée, du budget et du nombre et du type d'échantillons, la méthode de phénotypage la plus adaptée.**

Comparaison des phénotypes

Comparaison des résultats ELISA, PCR et qPCR dans des conditions peu favorables à l'infection

Le **Tableau 4** présente les résultats obtenus avec quatre modalités de phénotypage de plantes en essai à Pray en 2014 : 1) notation visuelle (NV) (0 : sain à 5 : symptômes forts et non ambigus); 2) DAS-ELISA (DE) utilisée qualitativement; 3) PCR simple - présence (1) - absence (0) de bande de produit PCR révélé sur gel. 4) Ct : nombre de cycles en qPCR pour atteindre un seuil donné de fluorescence. Des groupes de 4 ou 5 plantes ont été constitués sur la base de la notation visuelle « positive » (note visuelle supérieure à 1,5) ou « négative » (note visuelle inférieure à 1,5) croisée avec la notation ELISA utilisée qualitativement (ELISA négative : rapport de DO au témoin sain < 2 ; ELISA positive si >3). On obtient quatre groupes pour ces deux notations : (NV+, DE+), (NV-, DE-), (NV+, DE-) ; (NV-, DE+). Pour chaque groupe, les résultats de la PCR (présence (1)/absence (0) de bande) et de la qPCR (Ct) sont indiqués.

Tableau 4. Comparaisons fines des méthodes de phénotypage

	Note visuelle > 1,5			Note visuelle < 1,5		
	Echantillons	PCR	Ct	Echantillons	PCR	Ct
ELISA positives	D173	1	20	C154	1	18
	D399	1	22	C368	0	25
	C281	1	19	C158	1	17
	Pesc	1	22	C258	1	14
ELISA négatives	C140	0	35	C398	0	35
	C50	1	23	C351	0	33
	D397	1	21	C294	0	33
	D244	1	19	D163	0	35
				D224	0	31

Horizontalement : la moitié supérieure du tableau (caractères rouges) regroupe les données des échantillons ELISA positifs, soit les échantillons dont la DO est supérieure à trois fois celle du témoin négatif. La moitié inférieure (caractères sombres) regroupe les données associées aux échantillons ELISA négatifs. Verticalement : la moitié de gauche (fond jaune) contient les données des échantillons de note visuelle supérieure à 1,5 soit positifs pour ce seuil ; la moitié de droite (fond vert) contient les données des échantillons de note visuelle inférieure à 1,5 soit négatifs. Le tableau comporte quatre cases. La première colonne de chaque case comporte les codes des échantillons, la deuxième le résultat PCR (simple), la troisième les Ct.

On observe que les quatre échantillons, pour lesquels test ELISA et notation visuelle sont positifs, ont des PCR positives et des Ct de 22 à 19. L'ensemble de ces résultats est convergent. Les cinq échantillons négatifs pour la note visuelle et l'ELISA présentent des PCR négatives et des Ct de 31 à 35 ce qui est également un ensemble de résultats convergents. La situation des échantillons à test ELISA négatif et note visuelle positive est homogène pour tous les résultats PCR (PCR simple positive et Ct des qPCR de 19 à 23 d'une part ; PCR simple négative et Ct égal à 35, d'autre part) et trois fois sur quatre en faveur de la note visuelle (positive). En parallèle, les quatre échantillons ELISA positifs et de notes visuelles négatives présentent des Ct très nettement positifs trois fois sur quatre et convergents avec la PCR simple. Le Ct égal à 25 de l'échantillon C368 correspond à la valeur seuil de la PCR simple, négative dans nos conditions (pour les valeurs de Ct inférieures à 25, les PCR simples sont positives, elles sont négatives pour les échantillons de Ct supérieur ou égal à 25). Par ailleurs, les quantités et qualités d'ARN extraits ont été établies au Nanodrop et jugées comparables entre les échantillons.

On peut donc observer, dans les conditions d'infection étudiées et dans nos conditions de tests, une divergence entre la notation visuelle et l'ELISA. La plupart de ces cas sont arbitrés positifs par les PCR, (tous les échantillons sauf le C140). On peut attribuer cette différence à ce qui est observé ou prélevé pour établir ces notations : Il s'agit de la ligne entière de plantes au champ pour la notation visuelle, alors que seulement 0,4 g de feuilles sont

collectées sur l'ensemble des plantes de la ligne pour l'ELISA. De plus notre utilisation d'un tampon Citrate – urée pour le broyage des échantillons (cf. § ELISA et WSSMV plus haut) permet d'augmenter le nombre d'échantillons détectés positifs en ELISA. Il existe des échantillons visuellement négatifs qui s'avèrent fortement chargés en virus. Cela correspond à la définition des individus tolérants.

Comparaison inter années

Les données de phénotypages des années 2012 et 2014 ont été comparées. Celles-ci sont résumées **Figure 8** par une représentation des variables d'une analyse en composantes principales (ACP). L'ACP synthétise l'information, les variables de l'ACP sont construites à partir de l'ensemble des variables de phénotypages des génotypes présents plusieurs années en essai. Les combinaisons des variables sont projetées dans un plan. La longueur des vecteurs et l'angle entre deux vecteurs, permettent aisément de comparer visuellement ces variables. Ainsi un angle faible ou nul ou tendant vers 180°C indique une corrélation entre les variables représentées, un angle droit : leur absence de corrélation.

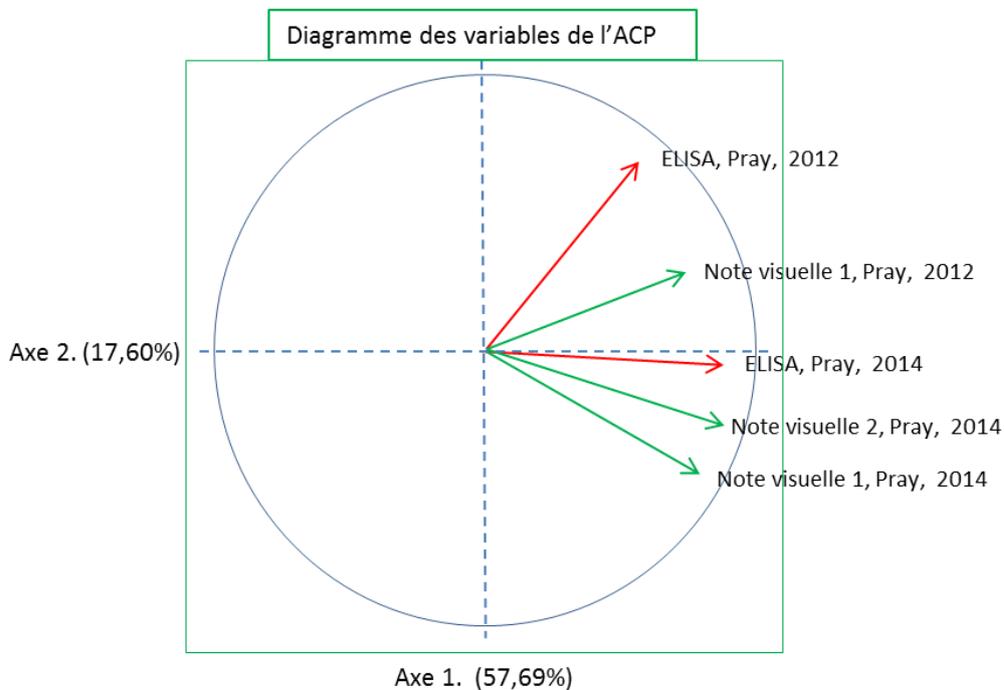


Figure 8. Représentation des variables de l'ACP des données de phénotypages en différents lieux et années.

Noms de variables : « ELISA, Pray, 2012 », « ELISA, Pray, 2014 » : DO ELISA mesurées sur les échantillons de Pray en 2012 et 2014, respectivement. « Note visuelle 1, Pray 2012 », « Note visuelle 1, Pray 2014 », « Note visuelle 2, Pray 2014 » : Notes visuelles attribuées aux plantes au champ à Pray en 2012 et 2014. Les notations visuelles 1 et 2 sont effectuées à un mois d'intervalle, au champ, par ARVALIS.

On observe, sur la représentation de la **Figure 9**, une relativement bonne corrélation intra année entre ELISA et note visuelle en 2012 et 2014 et une faible corrélation inter années entre les phénotypages ELISA ou note visuelles de ces deux années.

Discussion et conclusion

Nous avons présenté de manière détaillée plusieurs méthodes utilisées au laboratoire pour phénotyper la résistance du blé dur au WSSMV. Ces méthodes consistent à mesurer la charge virale présente dans les feuilles de blé dur. Certaines de ces méthodologies sont à notre connaissance, originales telles : le traitement quantitatif des données ELISA, l'extraction GES appliquée au WSSMV et le test de la semi quantification autorisée par la hauteur des pics d'électrophorogramme et la fabrication d'un produit de gamme qPCR purifié puis quantifié par simple dosage UV (au Nanodrop). Nous avons intégré des aspects économiques et pratiques (coûts, simplicité de mise en œuvre, possibilité d'étalement dans le temps) et également fiabilisé la procédure (traçabilité, faisabilité, représentativité et conservation de l'échantillon), afin de faciliter le choix de l'utilisateur.

Sur les simples plans méthodologiques et pratiques les protocoles ont pu être améliorés chaque année et ont dû être parfois modifiés. Ainsi le protocole ELISA comporte une préparation de jus de plante à partir d'un broyat constitué en utilisant habituellement le tampon PBS-Tween-PVP. Or, l'utilisation de ce tampon n'a plus permis en 2015 de détecter des échantillons virosés (confirmation par PCR) prélevés sur le même lieu (Pray) que les années précédentes. Le phénotypage ELISA 2015 a nécessité l'utilisation d'un tampon de broyage plus dénaturant, le tampon Citrate-urée. Cela peut s'interpréter comme la conséquence d'une modification des épitopes majoritaires dans la population virale de WSSMV à Pray en 2015. C'est-à-dire que la capsidie la plus fréquente dans la population des virus de Pray en 2015 n'est plus tout à fait la même que les années précédentes. Les anticorps utilisés proviennent d'un sérum et sont ainsi polyclonaux, cependant l'antigène utilisé a été produit par clonage de la capsidie d'une souche virale précise, probablement prélevée à St Chaptes (30) (Marie-Jeanne et al, 1999, et com. pers.). Le séquençage du gène de la capsidie d'un échantillon de Pray et du site d'origine de la souche virale utilisée pour la production des anticorps utilisés pour l'ensemble des tests ELISA validera cette interprétation.

Il apparaît que le phénotypage de la résistance du blé dur au WSSMV est plus complexe qu'attendu. La complémentarité des phénotypes note visuelle, ELISA et PCR permet de lever certaines ambiguïtés et de constater qu'il existe quelques individus qui divergent pour ces phénotypes.

Un phénotypage de la résistance du blé dur au WSSMV qui prendrait en compte l'ensemble des composantes reste à définir. Ainsi, la diversité des populations du vecteur et du virus et leurs variations géographiques et temporelles sous différentes pressions sont probablement informatives. Le séquençage de produits PCR représentatifs apportera probablement une ouverture pertinente.

Références bibliographiques

<http://www.franceagrimer.fr/filiere-grandes-cultures/Cereales/En-un-clic/Publications>, page consultée le 23/1/2015.

http://www.google.fr/url?sa=t&rCt=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDUQFjAC&url=http%3A%2F%2Fgcf.uta.edu%2FDocuments%2FPlantRNA_RIN.pdf&ei=FWXKVKyADct3UN25qfgN&usq=AFQjCNGo6kFyAizMettruehQpO5i7PRKsgA&bvm=bv.84607526.d.d24, , page consultée le 29/1/2015

Véronique Viader, Yan Holtz, Sylvain Santoni, Véronique Marie-Jeanne, Jacques David

Cadot V, Rolland M, Bonnefoy M, Hourcade D, Andro C, Delaunay A, Vandecasteele C, Perrot S, Herbert O, Viader V, David J (2014) Comparaison des méthodes de détection des mosaïques des blés (Bymovirus et Furovirus) par marquage moléculaire et par détection sérologique. *Innov Agron* **35** : 107-117.

Cardin L, Devergne JC, Pitrat M (1984) Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique. *Agronomie* **4** : 125-135.

Clark MF, Adams AN, Barbara DJ (1976) The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulturae* **57** : 43-49.

Clover G C, Henry C (1999) Detection and discrimination of wheat spindle streak mosaic virus and wheat yellow mosaic virus using multiplex RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* **105**: 891-896.

Deb M, Anderson JM (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. *J Virol Method* **148** : 17-24.

Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* **51A** :127-128.

Fleige S, Pfaffl M (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27** 126–139.

Gitton F, Diao A et al. (1999) A two-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection of soil-borne wheat mosaic virus and wheat spindle streak mosaic virus from France. *Plant Pathol* **48** : 535-641.

Hourcade D, Bonnefoy M, Cadot V, Delaunay A, Perrot S, Rolland M, Viader V, David J (2012) Recourir au marquage moléculaire pour confirmer le diagnostic. *Perspect Agric* n°387, mars 2012.

Kanyuka K, Ward E et al. (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* **4**: 393-406.

Lequin R M (2005) Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) *Clin Chem* **51**:12 2415-2418.

Marie- Jeanne V, Sohn A, Lesemann DE, Peyre J, Alliot B, Signoret PA (1999) Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz- *J Plant Dis Protect.* **106** : 554-659.

Sohn A, Schenk P, Signoret PA, Schmitz G, Schell J, Steinbiss H H (1994) Sequence analysis of the 3'-terminal half of RNA 1 of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus. *Arch Virol.* **135** :279-292.

Vaïanopoulos C (2008) *Wide spread occurrence of soil borne mosaic viruses in Belgium : preferential associations of Polymyxa graminis and mosaic viruses on cereals.* Mémoire de thèse, 211 pages.

Vaïanopoulos C, Legréve A, Lorca C, Moreau V (2006) Widespread Occurrence of *Wheat spindle streak mosaic virus* in Belgium. *Plant Dis.* **90** : 723-728.