



TEST ELISA (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSEY)

Lise Vézina, technicienne de laboratoire
Michel Lacroix, agronome-phytopathologiste
Direction de l'innovation scientifique et technologique

Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, le test ELISA est utilisé pour la détection de plusieurs virus végétaux ainsi que pour l'identification du pathovar ou de la sous-espèce de bactéries phytopathogènes comme *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.



Impatiens necrotic spot virus (INSV) sur le bégonia



Calibrachoa mottle virus (CbMV) sur le calibrachoa



Alfalfa mosaic virus (AMV) sur la luzerne



Chancre bactérien (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) sur la tomate



Bactériose (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*) chez le géranium

PRINCIPES DU TEST ELISA

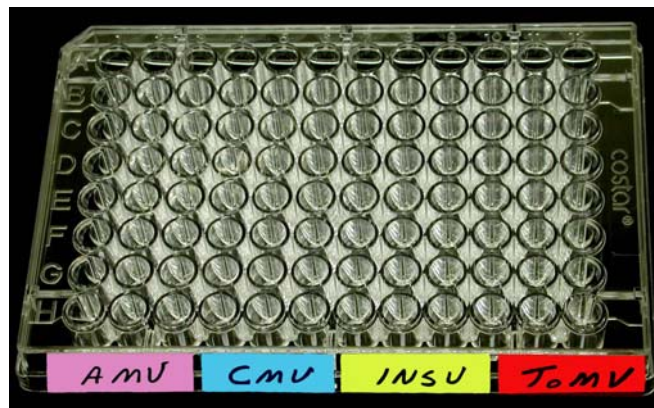
L'utilisation d'anticorps pour le diagnostic des maladies bactériennes et virales représente une méthode spécifique et rapide. Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire des vertébrés. Lorsqu'un antigène (composante étrangère) est présent chez un vertébré, des anticorps sont élaborés contre celui-ci. Il est possible de produire commercialement des anticorps destinés au diagnostic des maladies bactériennes et virales affectant les plantes. En injectant dans une souris ou un lapin, une cellule bactérienne, virale ou une de leurs composantes, des anticorps sont synthétisés contre cet antigène. À la suite du prélèvement du sang, les anticorps sont purifiés et ils peuvent être utilisés pour le diagnostic.

Sur une cellule bactérienne ou une particule virale, plusieurs sites antigéniques sont présents et chacun induit la production d'anticorps. L'injection d'un antigène engendre donc la synthèse de plusieurs types d'anticorps dont l'ensemble est qualifié d'**anticorps polyclonaux**. Il est possible d'obtenir des anticorps réagissant spécifiquement avec un seul site antigénique. Ces anticorps sont dits **monoclonaux**. La spécificité accrue des anticorps monoclonaux permet de réaliser des diagnostics des plus précis et fiables.

L'utilisation d'un anticorps spécifique à une bactérie ou à un virus phytopathogène et d'un anticorps conjugué à un enzyme sont les composantes de base permettant la détection et l'identification de ces organismes. Les enzymes généralement fixés aux anticorps sont la phosphatase alcaline et la peroxydase. L'addition d'un substrat spécifique à l'enzyme utilisé est alors transformé en sa présence et les produits issus de cette réaction présente une coloration jaune ou orange. Ainsi, le développement d'une coloration dans les puits d'une plaque de polystyrène, permet de confirmer l'identification de la bactérie isolée ou la présence du virus recherché dans des tissus végétaux.

RÉALISATION DU TEST ELISA

La réalisation d'un test Elisa se fait dans une plaque de polystyrène contenant généralement 96 puits.



RECOUVREMENT DES PUIITS PAR L'ANTICORPS DE RECOUVREMENT

Chaque test ELISA comprend :

- 3 puits servant à vérifier la qualité des tampons et des anticorps. Le premier puits sert de blanc (blank) afin d'établir la valeur de référence pour la lecture des densités optiques. Aucune suspension bactérienne ou extrait de plante n'est déposée dans ces puits.
- 3 puits pour le témoin négatif (suspension bactérienne autre que celle de l'espèce recherchée ou plant sain de la même espèce végétale pour la détection de virus).
- 3 puits pour le témoin positif (suspension d'une souche type de l'espèce bactérienne recherchée ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland N° 5) ou plante infectée par le virus recherché).
- Échantillons : deux suspensions bactériennes ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland N° 5) pour la bactérie à identifier ou deux broyats des tissus végétaux soupçonnés d'être infectés par un virus. Trois puits sont inoculés pour chaque suspension bactérienne et chaque broyat de tissus végétaux.

Il est important de préparer la solution d'anticorps de recouvrement (anticorps de capture) juste avant son utilisation. Déposer 100 µl de l'anticorps de recouvrement dans chacun des puits. La concentration de l'anticorps de recouvrement à déposer dans les puits doit tenir compte des spécifications de la compagnie fournissant les anticorps (ex. : 1,0 µg/mL). La plaque de polystyrène doit être recouverte d'un scellant afin d'éviter l'évaporation.

Selon la bactérie à identifier ou le virus recherché, l'incubation des plaques est de 4 heures à la température de la pièce ou 4 heures à 37°C ou toute la nuit à 4°C.

Après la période d'incubation, la plaque est lavée 4 fois avec un tampon de lavage. Il est des plus importants de bien assécher la plaque en la frappant vigoureusement sur un papier absorbant. Un résidu de tampons et d'anticorps demeurant dans les puits peut induire une fausse réaction positive.

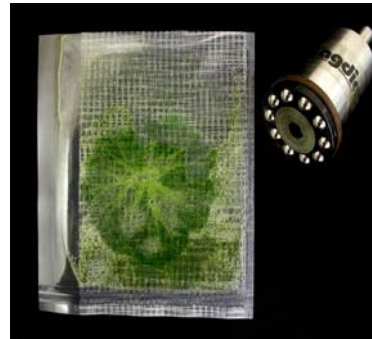


ADDITION DE L'ANTIGÈNE

Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, l'identification des bactéries par le test ELISA se fait toujours à partir d'une suspension bactérienne et non à partir d'un tissu végétal. Pour ce qui est des virus, leur détection se fait à partir de tissus végétaux. Les témoins négatif et positif sont préparés juste avant leur utilisation.

Pour les bactéries, deux suspensions bactériennes ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland N° 5) sont réalisées soit avec une souche type de l'espèce bactérienne recherchée (témoin positif) et la seconde avec une culture bactérienne de toute autre espèce (témoin négatif). Pour les virus, le témoin positif est constitué de tissus végétaux infectés par le virus recherché tandis que le témoin négatif est fait à partir de tissus végétaux sains de la même espèce végétale que l'échantillon reçu.

Pour les tissus végétaux, 0,5 grammes de l'échantillon de la plante reçue montrant des symptômes viraux sont déposés dans un sac pour broyage. Cette même manipulation est réalisée pour les tissus végétaux utilisés comme témoins positif et négatif pour la détection de virus. Les broyats doivent être conservés sur de la glace.



Un volume de 5 ml de tampon d'extraction est ajouté dans le sac de broyage (dilution 1/10). À l'aide d'un adaptateur à billes, les tissus sont broyés jusqu'à la liquéfaction.

L'addition de l'antigène dans la plaque ELISA se fait ainsi :

BACTÉRIES

- 100 µl de la suspension de la bactérie à identifier sont déposés dans les puits correspondants.
- 100 µl de la suspension de la souche type de la bactérie recherchée sont déposés dans les puits correspondants (témoin positif).
- 100 µl de la suspension de toute autre espèce bactérienne sont déposés dans les puits correspondants (témoin négatif).

VIRUS

- 100 µl de l'extraction des tissus végétaux de l'échantillon de plante présentant des symptômes viraux sont déposés dans les puits correspondants.
- 100 µl de l'extraction des tissus végétaux infectés par le virus recherché sont déposés dans les puits correspondants (témoin positif)
- 100 µl de l'extraction des tissus végétaux sains de la même espèce végétale que l'échantillon reçu sont déposés dans les puits correspondants (témoin négatif).

Si nous avons plusieurs échantillons à inoculer, la ou les plaques doivent être maintenues sur de la glace.

La plaque de polystyrène doit être recouverte d'un scellant afin d'éviter l'évaporation. L'incubation se fait toute une nuit à 4°C ou 2 heures à la température de la pièce. Si l'incubation se fait à 4°C, elle peut être prolongée de quelques jours.

Après la période d'incubation, la plaque est lavée 8 fois avec un tampon de lavage. Il est des plus importants de bien assécher la plaque en la frappant vigoureusement sur un papier absorbant. Un résidu de tampons demeurant dans les puits peut induire une fausse réaction positive.

ADDITION DE L'ANTICORPS LIÉ À L'ENZYME

L'anticorps lié à l'enzyme est préparé que 10 à 15 minutes avant sont utilisation. Une quantité de 100 µl de l'anticorps lié à l'enzyme est déposée dans chacun des puits. Il est important de tenir compte des spécifications de la compagnie fournissant les anticorps en regard de la concentration de l'anticorps conjugué.

La plaque de polystyrène doit être recouverte d'un scellant afin d'éviter l'évaporation. L'incubation est de 2 heures à la température de la pièce ou à 37°C selon l'organisme phytopathogène recherché.

Après la période d'incubation, la plaque est lavée 4 fois avec un tampon de lavage. Il est des plus importants de bien assécher la plaque en la frappant vigoureusement sur un papier absorbant. Un résidu de tampons et d'anticorps demeurant dans les puits peut induire une fausse réaction positive.

ADDITION DU SUBSTRAT DE L'ENZYME

Peroxydase = OPD (ortho-phénylène diamine)

Phosphatase = P-nitrophényl phosphate

Le substrat de l'enzyme est préparé juste avant son utilisation. Le substrat peut se conserver seulement quelques heures à la température de la

pièce ainsi qu'à la noirceur car il est photosensible. Une quantité de 100 µl de la solution substrat, ayant une concentration de 1,5 mg/ml de P-nitrophényl phosphate et de 1,0 mg/ml de OPD (ortho-phénylène diamine), est déposée dans chacun des puits.

La plaque doit être recouverte d'un papier d'aluminium ou mise dans une chambre noire puisque l'incubation doit se faire à la noirceur.

L'incubation se fait à la température de la pièce pour une durée de 20 à 30minutes.

LECTURE

Le test ELISA permet d'obtenir un résultat quantitatif qui se visualise par la présence d'une coloration dans les puits où l'organisme pathogène est présent. Plus la coloration est intense plus grande est la quantité de cellules bactériennes ou de particules virales. La présence d'une coloration dans un puits indique que l'anticorps lié à l'enzyme s'est fixé à l'antigène, lequel s'était fixé antérieurement à l'anticorps de recouvrement. En présence de la phosphatase, le substrat P-nitrophényl phosphate est hydrolysé en P-nitrophénol, lequel est un composé jaune. Quant à la peroxydase, cet enzyme dégrade le peroxyde (H₂O₂) et par la suite il y a une oxydation du substrat ortho-phénylène diamine (OPD) et formation d'un composé orangé ((OPD)₂H₂).

L'utilisation d'un lecteur de densité optique permet l'obtention d'un résultat quantitatif. Pour la lecture de la densité optique les filtres utilisés sont de 405 nm avec le P-nitrophényl phosphate et de 490 nm avec l'ortho-phénylène diamine .



Le premier puits est utilisé comme <blanc>. Ce puits contient tous les tampons et les anticorps mais aucune suspension bactérienne ni extraction de plante.

L'utilisation d'un anticorps lié à la peroxydase en présence du substrat ortho-phénylène diamine nécessite l'arrêt de la réaction en ajoutant 50 µl (1 goutte) d'acide sulfurique 3M. Une première lecture est réalisée avant l'addition de l'acide sulfurique. À la suite de l'addition de l'acide sulfurique une seconde lecture est faite. Il est également possible d'arrêter la réaction avec l'utilisation de l'enzyme phosphatase avec le substrat P-nitrophényl phosphate en ajoutant 50 µl (1 goutte) d'hydroxyde de sodium 3M. Cependant, l'arrêt de la réaction n'est pas nécessaire.

Les valeurs de la densité optique des puits contenant les solutions tampons et les témoins négatif et positif doivent être vérifiées rigoureusement pour s'assurer qu'elles correspondent à l'intensité de la coloration des puits.

L'examen visuel de la coloration des puits aide à l'interprétation des résultats :

- Phosphatase : jaune avec le substrat P-nitrophényl phosphate
- Peroxydase : jaune à orange avec le substrat ortho-phénylène diamine (OPD)



RÉFÉRENCES

Clark, M.F. et A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 : 475-483.

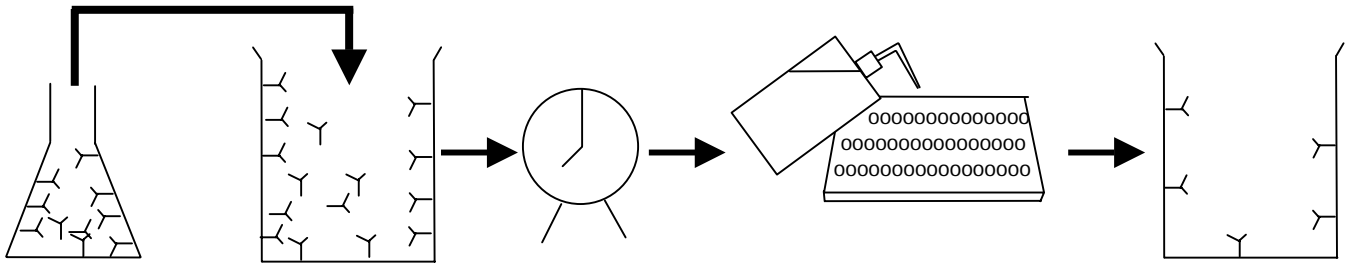
Agdia. Procédure «Reagent Set» pour DAS ELISA et direct ELISA peroxydase label et alkaline phosphatase label.

Les photos de ce document ont été réalisées par Chantal Malenfant, technicienne au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ.

Vous retrouverez ce document sur le site Agrireseau.qc.ca



1- RECOUVREMENT DES PUIITS

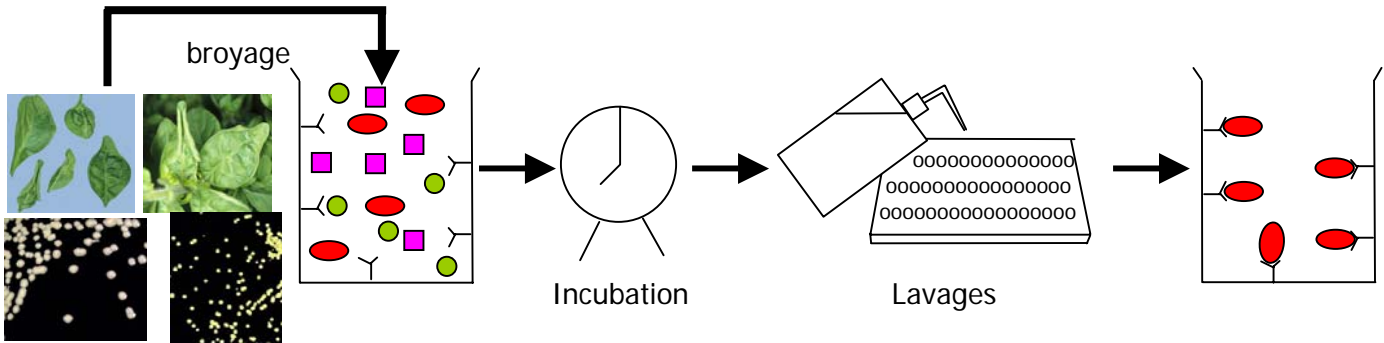


Anticorps de recouvrement

Incubation

Lavages

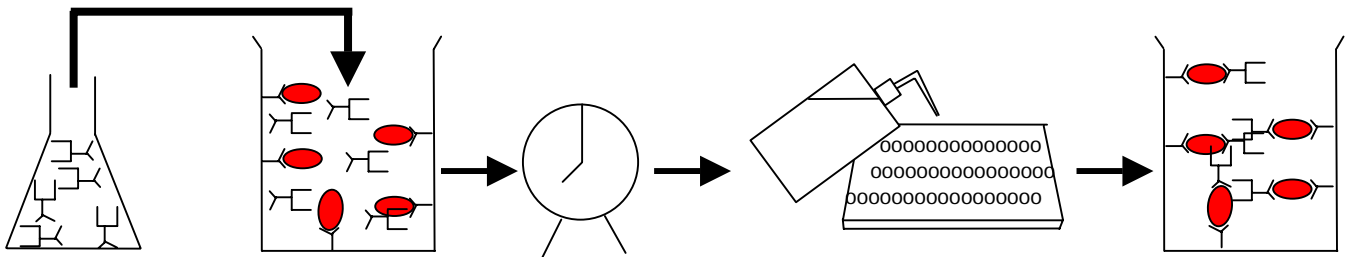
2- ADDITION DE L'ANTIGÈNE



Incubation

Lavages

3- ADDITION DE L'ANTICORPS LIÉ À L'ENZYME

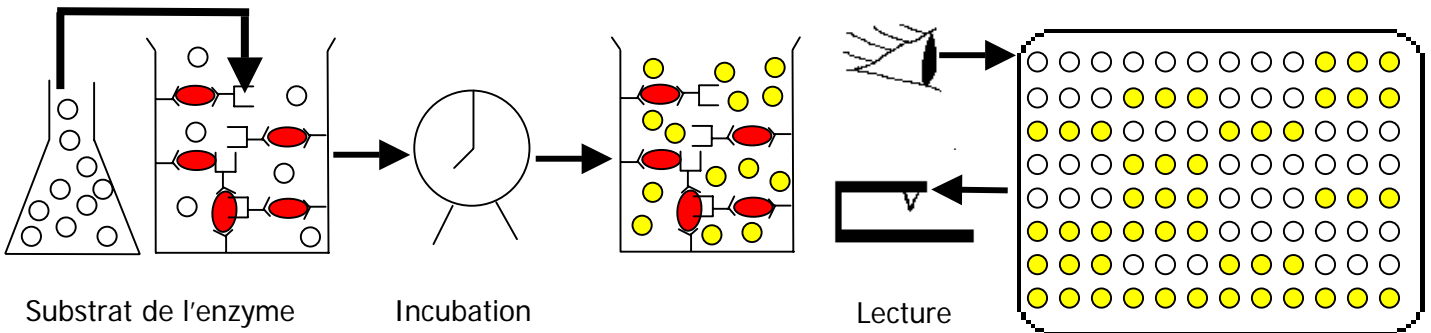


Anticorps lié à l'enzyme

Incubation

Lavages

4- ADDITION DU SUBSTRAT DE L'ENZYME ET LECTURE



Substrat de l'enzyme

Incubation

Lecture