

DEVELOPMENT OF AN ELISA TEST TO DETECT *PLASMOPARA HALSTEDII* ANTIGENS IN SEED.

Sandrine Bouterige, Raymond Robert, Agnès Marot-Leblond et Jean-Marcel Senet,
"Groupe d'Etudes des Interaction Hôtes-Parasites, Laboratoire de Parasitologie, Faculté de
Pharmacie d'Angers, 16 Bd Daviers, 49100 Angers.
Tel. 02 41 22 66 61, Fax 02 41 48 67 33.

Valérie Molinéro-Demilly, GEVES-SNES, 42 rue George Morel, 49071 Beaucouzé.
Tel 02 41 22 58 58, Fax 02 41 22 58 01

Résumé : Le tournesol cultivé, *Helianthus annuus L.*, est actuellement une des cultures oléagineuses les plus importantes dans le monde. Il est considéré comme la première plante annuelle cultivée spécifiquement pour son huile. Cette plante est régulièrement attaquée par *P. halstedii*, agent du mildiou du tournesol, qui est une des maladies les plus redoutée. Pour contrôler la qualité phytosanitaire des lots de semences, nous avons mis au point un test ELISA "double-sandwich" utilisant deux anticorps monoclonaux, 12C9/18E2. Ces deux anticorps reconnaissent des épitopes distincts et répétitifs présents sur trois antigènes de masse moléculaire 68, 140 et 192 kDa. Les résultats obtenus ont montré que ce test permet de différencier les lots sains des lots contaminés. Ce test a été validé par le test statistique non-paramétrique de Mann-Whitney.

Summary : Sunflower downy mildew, initiated by the fungus *Plasmopara halstedii*, is a potentially devastating disease. For the detection of the causative agent in seeds of sunflower, two monoclonal antibodies (MAbs), designated as 12C9 and 18E2, were produced by immunizing mice with a partially purified extract of *P. halstedii* race 1. The two MAbs detected all french races of *P. halstedii* in ELISA and no cross-reaction were observed with *Plasmopara viticola* or with other moulds pathogenic for sunflower or saprophytes. Both MAbs recognized the same fungal antigens represented by three components with molecular mass of 68, 140 and 192 kDa. However, their respective epitopes on the fungal antigens were found to be distinct and repetitive. Incubation of seed homogenates from infected plants into wells coated with MAb 18E2 resulted in the trapping of *P. halstedii* antigens which were revealed using biotinylated MAb 12C9. Conversely, no reaction was obtained with seed homogenates from healthy plants. Thus, our results suggest that these Mabs may constitute valuable tools for the development of a sandwich-ELISA detection system of the fungus in infected seeds. The non-parametric Mann-Whitney test was used for statistically evaluation of comparisons between infected and healthy seeds.

Introduction

Le mildiou est causé par un champignon, parasite biotrophe obligatoire, qui existe sous forme de races physiologiques, dont neuf sont répertoriées actuellement [10]. Ces races sont capables d'attaquer un nombre plus ou moins important de variétés de tournesol. En France, jusqu'à présent, cinq races de *P. halstedii* sont identifiées: la race 1 ou race européenne, la race A ou Indre proche de la race 4 Nord-Américaine, la race B ou Astaffort proche de la race 3 Nord-Américaine [7, 8] et les races C et D, apparues en 1995 [5]. En France, la superficie de culture est passée de 37000 ha en 1978 à 805000 ha en 1996 (Communication CETIOM). Une telle étendue géographique pose de nombreux problèmes, car certaines maladies sont préoccupantes au niveau économique. Le mildiou du tournesol, causé par *Plasmopara halstedii*, est une des maladies les plus redoutées. Une des causes de l'extension de cette maladie est l'utilisation de semences contaminées qui vont donner naissance soit à des plantes malades, soit à des oospores (formes de résistance) qui contamineront les cultures suivantes [3]. La possibilité de contrôler la qualité phytosanitaire des lots utilisés pourrait être un des moyens de limiter voire d'empêcher l'extension du pathogène. Ce contrôle pourrait être réalisé à l'aide de techniques de biologie moléculaire ou à l'aide de tests immunologique. Nous avons opté pour cette dernière approche et nous avons produit des anticorps monoclonaux pour mettre au point un test de détection immunoenzymatique type "sandwich" afin de contrôler les lots de semences. Deux des 16 anticorps monoclonaux (Acms) obtenus, 12C9 et 18E2, reconnaissant le champignon dans les semences ont été retenus pour la mise au point du test. De plus, ces Acms permettraient une meilleure connaissance de la biologie et de l'épidémiologie de ce parasite afin de mieux adapter les moyens de lutte existants, voir d'en mettre au point de nouveaux.

Matériels et méthodes

Culture de *P. halstedii* et des autres champignons. La culture de *P. halstedii* se fait par contamination artificielle des semences de tournesol selon la méthode de Cohen et Sackston [2] modifiée [1, 9]. Les autres champignons utilisés, sont cultivés en boîte de Pétri sur milieu Malt-Agar durant 1 à 2 semaines, en étuve à 20°C. Le *Plasmopara viticola* a été fourni par Mme Latorse (Rhône-Poulenc) après culture sur vigne.

Extraction des antigènes de *P. halstedii* et des autres champignons. Pour les *Plasmopara*, le champignon est récupéré par "grattage", en eau distillée, des cotylédons de tournesol ou des feuilles de vigne. Les autres champignons sont obtenus par "raclage" des géloses, en présence d'eau distillée. Les suspensions de champignons sont placées en bain-marie glacé puis soumises aux ultra-sons à l'aide de l'appareil Vibra-Cell (Bioblock-Scientific) pour une période de trois fois cinq minutes à puissance 24 watt. Après centrifugation à 12 000g pendant 10 minutes, les

différents surnageants, constituants les extraits bruts antigéniques, sont aliquotés et congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

Obtention des anticorps monoclonaux. L'immunisation des souris Balb/c est réalisée avec de l'extrait brut partiellement purifié de *P. halstedii* race 1. Cent µl d'antigène (500 µg/ml en eau physiologique) émulsionnés dans 100 µl d'adjuvant complet de Freund (Sigma) sont injectés aux souris en sous-cutané ou en intrapéritonéale. Deux rappels sont effectués à intervalle d'1 semaine, en utilisant les mêmes quantités d'antigène, en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Un dernier rappel est effectué la veille de la fusion par voie intraveineuse, en absence d'adjuvant de Freund. La fusion est réalisée, entre les splénocytes murins et les myélomes X63/Ag 8-653, selon le protocole de Dippold et ses collaborateurs (1980) modifié [6]. Le criblage des anticorps obtenus a été réalisé en ELISA, Western-blot et IFI. Les 2 anticorps sélectionnés, 12C9 et 18E2, ont été produits en culture cellulaire puis les hybridomes ont été injectés, en intrapéritonéale, au souris Balb/c inoculées 10 jours avant avec 0,5 ml de pristane® (2, 6, 10, 14 tétra méthyl penta décane, Sigma) toujours par voie intrapéritonéale. Après récupération de l'ascite, les Ig G ont été purifiées et marquées à la biotine selon le protocole de Guesdon *et al* [4].

Biotinylation des anticorps monoclonaux. Les Ig G purifiées (3 mg/ml) sont mises à dialyser une nuit à 4° C contre du tampon borate 0,1 M pH 8,8 , avant d'ajouter la solution de biotine (6. Biotinamidocaproylamido) caproic acid N-Hydroxysuccinimide ester, 10 mg/ml en DMSO, Sigma) à raison de 250 µg/mg d'anticorps. Les Ig G marquées sont dialysées contre du PBS-azide (1‰) puis aliquotées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

Extraction des antigènes des lots de semences. Les 20 lots de semences à tester (10 sains et 10 contaminés) sont broyés en azote liquide. Les poudres obtenues sont reprises en eau distillée (20 ml) avant d'être soumises aux ultra-sons, dans les mêmes conditions que décrit ci-dessus. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, les surnageants sont aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Principe du test ELISA "Double sandwich". Le premier anticorps, 18E2, en solution dans du PBS (Phosphate Buffered Saline), est incubé dans une plaque pour microtitration, à raison de 100 µl durant 1 heure à 37°C. Les anticorps libres sont éliminé par 3 lavages en PBS-Tween 0,5‰ et la plaque est ensuite "saturée" avec de l'albumine bovine à 3% en PBS (200 µl/puits), pour prévenir toute fixation non spécifique ultérieur de protéines. L'échantillon à tester est ajouté, à raison de 100 µl/puit, et se fixe à l'anticorps présent sur la plaque durant 1 heure à 37°C. L'antigène fixé est détecté par le deuxième anticorps, 12C9 marqué à la biotine (100 µl/puit, à 37°C durant 1 heure). Les anticorps libres sont ensuite éliminés par 3 lavages et les anticorps

biotinylés fixés sont mis en évidence par addition de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (100 µl/puit, 30 minutes à 37°C). L'activité enzymatique est révélée par ajout d'une solution de révélation (100 µl/puit) et mesurée par lecture de la plaque à l'aide d'un spectrophotomètre "Titertek-Multiskan MC" à 405 nm (Flow Laboratories) après arrêt de la réaction par du NaOH 3N (25 µl/puit). Afin de vérifier la validité du test et voir si les différences obtenues, entre lots sains et contaminés, sont bien significatives, une étude statistique a été réalisée suivant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Résultats

Spécificité des antigènes reconnus. Cette spécificité est vérifiée par technique ELISA sur les extraits bruts de *Plasmopara viticola* et des principaux champignons saprophytes ou pathogènes du tournesol, rencontrés sur les semences et la plante. Avec les 2 anticorps monoclonaux sélectionnés pour la mise au point du test, aucune réaction croisée n'est observée que se soit pour le *P. viticola* ou les autres champignons testés.

Sensibilité théorique du test. Les différents paramètres du test sont également déterminés par technique ELISA. La concentration de l'anticorps à utiliser pour sensibiliser la plaque est donnée par sa courbe de titration. Cette concentration correspond à la quantité d'anticorps nécessaire pour obtenir 100% de fixation sur l'antigène. La détermination de la concentration de l'anticorps biotinylé se fait de la même façon. Les résultats des différentes expériences ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus en fixant le 18E2 sur la plaque, à raison de 10 µg/ml, et en révélant la présence des antigènes par l'anticorps 12C9 biotinylé, à raison de 8 µg/ml. Le seuil de sensibilité du test ELISA est obtenu en faisant varier la quantité d'antigène de *P. halstedii* déposé. Il a été évalué à environ 50 pg/ml.

Détection des antigènes dans les semences. Vingt lots de graines, 10 sains et 10 contaminés provenant de différentes régions de France, ont été testés. Les résultats (Tableau 1), montrent que les lots sains donnent tous une réponse négative. Les lots contaminés présentent pour 9 d'entre eux une réponse positive avec des degrés de contamination plus ou moins importants. Cette étude montre que les différences obtenues sont hautement significatives pour une valeur de $p < 0,01$.

Discussion

Le résultat des tests de "spécificité" des antigènes reconnus par les 2 anticorps monoclonaux choisis montrent que les 3 antigènes, de masse moléculaire 68, 140 et 192 kDa, sont spécifiques du *P. halstedii*. L'étude des épitopes reconnus par ces deux MAbs a montré que ces épitopes sont distincts et répétitifs. Le choix d'une technique Immunoenzymatique, pour la mise au point d'un

outil de détection, a été orienté par le fait que ce sont des techniques extrêmement sensibles qui permettent la détection d'antigènes à des concentrations très faibles, et qu'elles sont extrêmement économiques en ce qui concerne la consommation des réactifs. En effet, la détermination des paramètres du test montre qu'en utilisant de faibles concentrations d'anticorps (10 µg/ml pour le 18E2 et 8 µg/ml pour le 12C9 biotinylé) on peut détecter le pour une concentration d'antigène extrait d'environ 50 pg/ml. Le contrôle de la qualité phytosanitaire des semences est une des conditions indispensables pour la réussite ultérieure d'une culture. La possibilité de contrôler les lots utilisés permettrait d'éviter de faire entrer sur le territoire de nouvelles races du parasite jusqu'à présent absentes. Elle permettrait également d'éviter sa dissémination en le confinant aux zones où il est présent, en attendant de mettre au point de nouvelles stratégies de lutte anti-mildiou.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]-**CHAMPION R., 1983.** Essais de résistance des cultivars aux maladies en France. *Seed Sci. Technol.*, **11**, p 681-690
- [2]-**COHEN, Y., and W. E. SACKSTON. 1973.** Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.* **5**:15-22.
- [3]-**DÖKEN, M. T. 1989.** *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni in sunflower seeds and the role of infected seeds in producing plants with systemic symptoms. *J. Phytopathol.* **124**:23-26.
- [4]-**GUESDON, J. L., T. TERNYNCK, and S. AVRAMEAS. 1979.** The use of avidin-biotin interaction of immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27**:1137-1139.
- [5]-**LAFON, S., PENAUD A., WALSER P., DE GUENIN M. C., MOLINERO V., MESTRE R., et TOURVIELLE DE LABROUHE D., 1996.** Le mildiou du tournesol toujours sous surveillance. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **484**, p 35-37.
- [6]-**MAROT-LEBLOND A., ROBERT R., AUBRY J., EZCURRA P. AND SENET J.M., 1993.** Identification and immunochemical characterization of a germ tube specific antigen of *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **7**, p 175-186.
- [7]-**MOUZEYAR S., WALSER P., et TOURVIELLE D , 1994.** Mildiou du tournesol : une nouvelle interprétation du test de résistance. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **461**, p 25-26.
- [8]-**TOURVIELLE D., MOUZEYAR S., LAFON, S. et REGNAULT Y., 1991.** Evolution des races de mildiou (*Plasmopara helianthii*) sur tournesol, en France. In : 3^{ème} Conférence internationale sur les maladies des plantes, Bordeaux, p 777-784.

[9]-VEAR F., et TOURVIEILLE D., 1987. Test de résistance au mildiou chez le tournesol. CETIOM, Information Techniques, **98**, p 19-20.

[10]-VIRANYI F. AND GULYA T.j., 1995. Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) from hungary. Plant Pathology, **44**, p 619-624.

Tableau 1 : Détection du pathogène dans des lots de semences provenant de plantes saines et malades.

Echantillon à tester	Origine géographique	Valeurs de DO
Contrôle		0.115 ± 0.012
Plantes infectées		
Lot 1	Beaune (Cote d'Or)	0.460 ± 0.083
Lot 2	Beaune (Cote d'Or)	0.470 ± 0.066
Lot 3	Beaune (Cote d'Or)	0.556 ± 0.053
Lot 4	Beaune (Cote d'Or)	0.291 ± 0.052
Lot 5	Beaune (Cote d'Or)	1.161 ± 0.140
Lot 6	Chappes (Puy-de-Dome)	0.415 ± 0.080
Lot 7	Chappes (Puy-de-Dome)	0.476 ± 0.012
Lot 8	Chappes (Puy-de-Dome)	0.395 ± 0.034
Plantes saines		
Lot 9	Mazé (Maine-et-Loire)	0.093 ± 0.013
Lot 10	Corné (Maine-et-Loire)	0.117 ± 0.014
Lot 11	Brissac (Maine-et-Loire)	0.087 ± 0.025
Lot 12	St. Saturnin (Maine-et-Loire)	0.094 ± 0.015
Lot 13	Doué (Maine-et-Loire)	0.085 ± 0.027
Lot 14	Les Alleuds (Maine-et-Loire)	0.071 ± 0.005
Lot 15	Clermont-Ferrand (Puy-de-Dome)	0.077 ± 0.015

Les résultats (valeurs de DO à 405 nm) correspondent à la valeur moyenne de trois essais ± SD.