



**HAL**  
open science

## **Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique**

Loïc Cardin, Jean-Claude Devergne, Michel Pitrat

### ► **To cite this version:**

Loïc Cardin, Jean-Claude Devergne, Michel Pitrat. Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique. *Agronomie*, 1984, 4 (2), pp.125-135. <hal-00884619>

**HAL Id: hal-00884619**

**<https://hal.science/hal-00884619v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique

Loïc CARDIN, Jean-Claude DEVERGNE & Michel PITRAT (\*)

I.N.R.A., Station de Botanique et de Pathologie végétale, 62, boulevard du Cap, F 06602 Antibes

(\*) I.N.R.A., Station d'Amélioration des Plantes, Centre de recherches d'Avignon, F 84140 Montfavet

## RÉSUMÉ

Le test immunoenzymatique ELISA (type « sandwich ») peut être utilisé pour le dosage du virus de la mosaïque du concombre (CMV) à condition de se placer dans des conditions expérimentales strictement définies qui sont indispensables si l'on veut obtenir une précision acceptable dans les estimations fournies par la méthode. Une étude réalisée avec des préparations de CMV purifié stabilisé fait en effet apparaître des variations importantes dans les valeurs de densité optique (D.O.) enregistrées pour une même concentration en antigène. Les variations que l'on observe avec les deux types de support étudiés (plaques MICROELISA et cuvettes PAK) sont souvent liées à la position des puits ; elles limitent sensiblement les possibilités de dosage.

Il est possible de remédier en partie à ces inconvénients en éliminant des puits situés en bordure, en prenant en considération les différences de densité optique ( $\Delta$  D.O.) entre deux lectures successives et en procédant, pour chaque extrait analysé, à plusieurs mesures selon un schéma de dépôt préalablement établi (cas des cuvettes PAK). Dans ces conditions, les coefficients de variation sont inférieurs à 10 p. 100 pour des teneurs en antigène comprises entre 250 et 25 ng/ml.

Dans cette gamme de concentrations, il existe une bonne corrélation linéaire (au seuil 0,01) entre les valeurs de  $\Delta$  D.O. et les log. des concentrations en virus. Ainsi, une droite de régression, établie à partir des  $\Delta$  D.O. correspondant à 4 dilutions d'une préparation antigénique « standard » permet, par comparaison, d'estimer la teneur en virus d'un extrait inconnu. Il suffit d'incorporer un seul « standard » dans chaque essai, les droites de régression établies dans plusieurs cuvettes étant en général parallèles.

En revanche, la mauvaise reproductibilité de la méthode, due vraisemblablement à des variations dans les conditions d'hydrolyse du substrat, nécessite de disposer d'un « standard » dans chaque essai. En raison de l'instabilité du virus de la mosaïque du concombre, la préparation « standard » utilisée dans plusieurs essais successifs doit obligatoirement être stabilisée par le formaldéhyde. Les conséquences de cette stabilisation sur le comportement du virus en ELISA sont discutées.

En dépit de ces imperfections, le test immunoenzymatique ELISA apparaît comme la méthode actuellement la mieux adaptée pour le dosage rapide du virus de la mosaïque du concombre dans le cadre de l'analyse systématique d'un grand nombre d'échantillons.

**Mots clés additionnels :** *Reproductibilité d'ELISA, stabilisation du CMV, corrélation concentration-densité optique.*

## SUMMARY

*Use of the ELISA test to estimate the concentration of cucumber mosaic virus (CMV).*

### *I. Methodological aspects.*

The ELISA test (double antibody sandwich type) can be used as a quantitative method of estimating the concentration of cucumber mosaic virus (CMV).

Strictly defined experimental conditions had to be observed to obtain acceptable accuracy in the estimations. A study with purified and stabilized preparations of CMV showed much variation in the absorbance values (O.D.) for the same antigen concentration. This variation, observed with both MICROELISA plates and PAK cuvettes, restricted the quantitative reliability of the method appreciably. It was possible to remedy these inconveniences partly (I) by eliminating the outer rows of wells, (II) by taking into consideration the differences between two successive recordings of absorbance values ( $\Delta$  O.D.), and (III) by taking several measurements of each tested sample following a previously established loading scheme. Under these conditions, coefficients of variation were less than 10 per cent for antigen concentrations between 25 and 250 ng/ml.

In this concentration range, a good linear relationship (with  $p = 0.01$ ) existed between  $\Delta$  O.D. values and log antigen concentration. Therefore, a regression line fitted to data obtained from dilutions of a "standard" antigen preparation could be used in a comparative method to estimate the antigen content of an unknown sample.

One "standard" was enough for each test, as the regression lines obtained in different cuvettes were generally parallel. However, lack of reliability between assays, probably due to variation in operational conditions during substrate hydrolysis, necessitated the incorporation of a "standard" into each assay.

Owing to the instability of cucumber mosaic virus, the "standard" preparation used in several assays should obligatorily be stabilized with formaldehyde. The consequences of such a treatment on the behaviour of the virus in ELISA are discussed.

At the present time, despite its imperfections, the ELISA test appears to be the most suitable procedure for a rapid estimation of CMV concentrations when a large number of samples is to be tested.

**Additional key words :** *Reliability of ELISA, CMV stabilization, correlation between absorbance and concentration.*

## I. INTRODUCTION

Le test ELISA est de plus en plus employé pour la détection de virus phytopathogènes. On apprécie surtout sa grande sensibilité et sa facilité d'exécution qui en font une méthode de choix lorsqu'on doit procéder à l'indexage systématique de lots importants de plantes soumises à un contrôle virologique (sélection sanitaire). Mais l'utilisation d'anticorps couplés à une enzyme présente également un autre intérêt tout aussi remarquable. La réaction colorée qui résulte de l'hydrolyse du substrat peut être appréciée quantitativement par photométrie, ce qui offre des possibilités de dosage.

Les méthodes enzymo-immunologiques sont maintenant couramment utilisées en recherche médicale pour le dosage de protéines dont la présence dans les fluides biologiques est un élément déterminant du diagnostic clinique. Les protocoles réactionnels sont multiples. Les techniques qui font appel à des antigènes marqués sont de type compétitif et s'inspirent directement des dosages radio-immunologiques. Elles ont souvent lieu en milieu liquide, mais certaines font aussi parfois intervenir un immunoadsorbant. Un tel système avait été décrit en France, dès 1971, par AVRAMEAS & GUILBERT pour le dosage des immunoglobulines G.

Le terme « ELISA » a été employé pour la première fois par ENGVALL & PERLMANN (1971a) à propos d'une méthode de dosage de certains anticorps spécifiques. Les auteurs utilisaient pour cela l'antigène insolubilisé homologue des anticorps recherchés, ainsi que des anti-anticorps marqués. Ce procédé a eu par la suite de nombreuses applications.

Dans le système dit « sandwich », l'antigène que l'on veut doser se fixe sur un immunoadsorbant constitué par des anticorps spécifiques insolubilisés ; il est ensuite révélé par des anticorps spécifiques marqués. Ce système a été notamment utilisé par MAIOLINI & MASSEYEFF (1975) pour le dosage de l'alpha-fetoprotéine.

Dans une gamme de concentrations de 10 à 1 000 ng/ml, la méthode possède une sensibilité et une reproductibilité identiques à celles du dosage radio-immunologique. FERROA *et al.* (1980) ont adopté une technique similaire pour le dosage de la bêta-2-microglobuline.

En phytovirologie, c'est également la méthode « sandwich » qui a été préconisée par CLARK & ADAMS (1977) pour la détection rapide des virus de plantes. Elle reste encore, dans ce domaine, la plus utilisée. Mais on remarquera que peu d'études ont été consacrées à l'aspect quantitatif du test ELISA, comparées aux très nombreux travaux traitant de la simple détection (MEHRAD *et al.*, 1978 ; MARCO & COHEN, 1979 ; DEVASH *et al.*, 1982). La raison pourrait en être les difficultés rencontrées dans l'interprétation des résultats dont la reproductibilité n'est pas toujours satisfaisante (CLARK, 1981). Ces difficultés ne sont pas uniquement liées à la technique employée, elles dépendent aussi du modèle étudié.

Nous avons choisi comme modèle le virus de la mosaïque du concombre (CMV) dont on connaît maintenant bien les propriétés immunologiques (DEVERGNE, 1974) depuis que l'on sait purifier et stabiliser l'antigène viral (SCOTT, 1963 ; LOT *et al.*, 1972 ; FRANCKI & HABIL, 1972). Ce virus est extrêmement polyphage (DOUINE *et al.*, 1979). Il en existe de nombreuses souches que l'on peut parfois distinguer sérologiquement (DEVERGNE & CARDIN, 1973). Ainsi, les méthodes sérologiques (immunodiffusion double) ont pu être utilisées dans le cadre d'une étude épidémiologique, pour détecter et identifier ces souches dans les espèces sauvages et cultivées du sud de la France (DEVERGNE *et al.*, 1978 ; QUIOT *et al.*, 1979a et b).

Quelques essais de dosage par ELISA avaient également été tentés pour suivre la multiplication du CMV dans le tabac (DEVERGNE & CARDIN, 1979). Les difficultés que nous avons alors rencontrées nous ont amenés à définir les conditions expérimentales optimales pour effectuer un tel dosage. L'intérêt de cette étude apparaît surtout au niveau de ses nombreuses applications en amélioration des plantes, dont un exemple sera discuté dans la publication suivante (DEVERGNE *et al.*, 1984).

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Antigène

Dans cette étude méthodologique, nous avons exclusivement utilisé comme antigène standard la souche CMV-D d'origine « tomate ». Le virus est purifié à partir de tabac (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi* nc.) selon la méthode de LOT *et al.* (1972) :

Après extraction dans une solution de citrate trisodique 0,5 M, clarification à volume égal par le chloroforme et relargage par le polyéthylène glycol 6 000 à 10 p. 100, le virus est sédimenté par une ultracentrifugation différentielle de 1 h 30 à 40 000 g. Une analyse en gradient de saccharose 5-30 p. 100 permet de le séparer des protéines normales de l'hôte. Le virus recueilli, centrifugé une nouvelle fois à 40 000 g, est repris dans un faible volume d'eau distillée et stabilisé par le formaldéhyde. La stabilisation s'opère sur un extrait contenant 4 à 8 mg/ml de virus en lui ajoutant goutte à goutte un volume égal d'une solution de formol à 0,4 p. 100 dans l'eau. Après un repos de 24 h à 4 °C, cet extrait est clarifié par une centrifugation à faible vitesse et dosé au spectrophotomètre ; la teneur en virus, évaluée sur la base d'un coefficient d'extinction  $E_{260}^{0.1} = 5$  (KAPER *et al.*, 1965), est ramenée à 1 mg/ml et la préparation standard ainsi obtenue conservée à 4 °C.

Avant chaque épreuve ELISA, la teneur en virus du standard est à nouveau contrôlée au spectrophotomètre. Une perte apparente inférieure à 10 p. 100 est considérée comme la preuve d'une bonne conservation. En tenant

compte de cette nouvelle estimation, des extraits dosant entre 500 et 15,6 ng/ml de virus sont ensuite préparés par dilutions successives d'un petit volume du standard dans une solution de citrate trisodique 0,05 M contenant 2 p. 100 de polyvinylpyrrolidone (PVP) et 0,2 p. 100 de sérum albumine bovine (BSA).

## B. Antisérums

Un sérum anti-CMV (852) a été préparé au laboratoire par immunisation d'un lapin avec une préparation purifiée d'antigène CMV-D stabilisé (injections intramusculaires d'environ 1 mg de virus chacune, avec adjuvant complet de FREUND). Le titre de ce sérum est de 1/512 en immunodiffusion double en gélose. Une fraction enrichie en immunoglobulines a été obtenue par relargage de ce sérum par le sulfate de sodium anhydre puis les anticorps spécifiques du CMV-D séparés à l'aide d'un immunoabsorbant. L'antigène CMV-D, polymérisé en présence de glutaraldéhyde, est utilisé pour fixer ces anticorps qui sont ensuite élués dans un tampon glycine de pH 2,8. Cette préparation d'anticorps a été employée comme « coating ». Elle a également servi à la préparation d'un conjugué d (8521), après couplage avec la phosphatase alcaline (SIGMA type VII) selon la technique d'AVRAMEAS (1969).

Toutes les épreuves ELISA mentionnées dans cette étude ont été réalisées avec le conjugué d (8521) employé à la même concentration. Pour cela, les anticorps marqués ont été dilués dans un tampon phosphate contenant 0,8 p. 100 de ClNa et 0,5 p. 100 de Tween 20 (milieu PBS-T) additionné en outre de 2 p. 100 de PVP et 0,2 p. 100 de BSA.

## C. Test immunoenzymatique ELISA

Le protocole expérimental de type « sandwich » est étalé sur 2 jours. La veille du test, le support est sensibilisé par 250 µl d'anticorps déposés dans chaque puits (dosés à 1 µg/ml dans un tampon carbonate de pH 9,6). Après une incubation d'une nuit à la température ambiante, on procède à 3 lavages successifs avec du PBS-T. Les échantillons à éprouver (préparation d'antigène CMV-D purifié diluée immédiatement avant l'emploi) sont distribués dans les puits (250 µl) et incubés pendant 5 h à 37 °C. Après 3 nouveaux lavages, 250 µl de « conjugué » sont à leur tour déposés dans chaque puits. L'incubation du conjugué se prolonge toute la nuit à la température ambiante. La réaction enzymatique a lieu le lendemain matin. Le substrat (p. nitrophényl phosphate dosé à 0,7 mg/ml dans un tampon diéthanolamine de pH 9,8) est incubé à 37 °C. Pour chaque essai, on effectue plusieurs lectures successives à 405 nm, après des temps d'incubation variables de 30 mn à 3 h. Les témoins sont représentés par le même milieu (citrate 0,05 M, PVP, BSA) que celui utilisé pour les dilutions de l'antigène purifié.

Le test ELISA est réalisé soit dans des plaques MICRO-ELISA (COOKE M129B, DYNATECH), soit dans des cuvettes PAK (GILFORD).

Sur chaque plaque MICROELISA on dispose de 96 puits placés en 8 « lignes » de 12, répertoriées de A à H et 12 colonnes de 8 numérotées de 1 à 12. Le dépôt des réactifs est effectué à l'aide d'un distributeur AUTODROP TITERTEK. Pour les lavages, on a utilisé un appareil SKATRON A.S., MULTIWASH, et pour les lectures un photomètre MULTISKAN (FLOW, Lab.).

La cuvette PAK est constituée de 5 « barrettes » (numérotées de I à V) comprenant chacune 10 puits en position 1 à

10. Par analogie avec les plaques, on parlera à leur propos, de « lignes » 1 à 10, chaque ligne comprenant alors 5 puits, correspondant aux 5 barrettes de la cuvette. Dans le cas des cuvettes PAK, toutes les opérations (dépôt des réactifs, lavages et lectures) ont été traitées à l'aide d'un analyseur EIA. PR50 (GILFORD).

L'automatisation de toutes les étapes du test (à l'exception du seul dépôt des échantillons, effectué manuellement) devait permettre d'espérer une reproductibilité maximum de la méthode.

## III. RÉSULTATS

Pour que le test ELISA puisse être utilisé à des fins de dosage, il faut qu'il satisfasse à certaines exigences :

A) On doit pouvoir faire correspondre au même extrait, ou à une même concentration connue en antigène, une seule et même valeur de densité optique (D.O.) (étude de la variabilité de la méthode).

B) Il doit exister une relation simple entre la teneur en antigène d'un extrait et la valeur de la densité optique qui lui correspond (étude de la corrélation concentration-D.O.).

### A. Étude de la variabilité de la méthode

#### 1. Dispersion des mesures de D.O.

Si l'on dépose 250 µl d'un extrait de virus CMV-D purifié dans tous les puits d'une unité de traitement (plaque MICROELISA ou cuvette PAK), on constate que les D.O. enregistrées au même moment dans chaque puits présentent une certaine dispersion autour d'une valeur moyenne. Cette dispersion peut être estimée par le coefficient de variation (C.v.). Plusieurs essais réalisés avec 4 concentrations en antigène (250 - 125 - 62,5 et 31,25 ng/ml) ont permis de suivre l'évolution des D.O. et des C.v. au cours de l'incubation du substrat, soit dans les plaques MICROELISA (tabl. 1), soit dans les cuvettes PAK (tabl. 2).

En début d'incubation, alors que les D.O. sont encore peu élevées, les C.v. sont généralement supérieurs à 10 p. 100 (supérieurs à 20 p. 100 pour les faibles concentrations en cuvette PAK). Au cours de l'hydrolyse, ces valeurs diminuent progressivement au fur et à mesure que les D.O. augmentent.

Dans les plaques, après 1 h d'incubation, l'extrait dosé à 250 ng/ml donne une D.O. moyenne de 1,5 unité ; les C.v. se situent alors entre 5 et 10 p. 100 pour les 4 concentrations choisies. Dans les cuvettes PAK, où l'hydrolyse est plus lente, il faut 2 h d'incubation pour obtenir des valeurs de D.O. comparables et des C.v. inférieures à 10 p. 100, pour les concentrations 250 et 125 ng/ml seulement. Pour les concentrations plus faibles, la poursuite de l'hydrolyse permet d'augmenter les D.O. sans que diminuent pour autant les valeurs des C.v. Des lectures faites entre 3 et 8 h d'incubation montrent que ceux-ci sont encore compris entre 10 et 15 p. 100. Il semble donc, qu'indépendamment des valeurs de D.O., les C.v. soient plus faibles pour les concentrations en virus les plus élevées (250 et 125 ng/ml).

#### 2. Influence de la position des puits

Pour une même concentration en antigène, les D.O. les plus fortes correspondent fréquemment à des puits situés en position marginale. Les figures 1 et 2 donnent un exemple de la répartition des moyennes de D.O. calculées pour chaque ligne et chaque colonne d'une plaque MICROELISA

TABLEAU 1

Evolution des moyennes ( $\bar{X}$ ) de D.O. et des coefficients de variation (Cv) entre 15 et 60 mn d'incubation du substrat (plaque « MICROELISA »).  
Change in absorbance and coefficient of variation from 15 to 60 mn of substrate incubation (MICROELISA plates).

Concentration (ng/ml)	Essai	Durée d'incubation du substrat (mn)					
		15		30		60	
		$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV
250	I	306	11,9	659	9,2	1 470	7,5
	II	361	11,8	721	7,3	1 595	6,1
125	I	173	13,2	429	9,9	994	8,4
	II	254	11,4	561	8,2	1 177	6,4
62,5	I	239	13,7	398	7,8	743	5,9
	II	281	7,1	447	7,4	799	5,8
31,25	I	66	18,2	157	11,3	300	11,3
	II	87	12,1	176	9,9	354	9,1

Moyennes  $\bar{X}$ , exprimées en millièmes de D.O., de 96 valeurs correspondant aux D.O. lues pour un même extrait de virus purifié dosé, déposé dans tous les puits d'une plaque « MICROELISA ».

Deux essais pour chacune des 4 concentrations choisies.

Mean absorbances ( $\bar{X}$ ) of 96 values of O.D. recorded in all the wells of a microplate, loaded with a purified virus preparation used at 4 concentrations (2 tests for each concentration).

TABLEAU 2

Evolution des moyennes ( $\bar{X}$ ) de D.O. et des coefficients de variation (Cv) entre 30 et 120 mn d'incubation du substrat (cuvette PAK).  
Change in absorbance and coefficient of variation from 30 to 120 mn of substrate incubation (PAK cuvettes).

Concentration (ng/ml)	Essai	Durée d'incubation du substrat (mn)					
		30		60		120	
		$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV
250	I	316	15,9	712	12,1	1 576	8,1
	II	470	9,5	751	6,6	1 143	5,3
	III	355	11,5	742	7,5	1 179	8,3
125	IV	541	11,4	1 372	7,8	1 826	4,3
	II	291	12,4	468	9,6	714	7,9
	III	204	15,8	408	12,1	653	10,5
62,5	II	133	20,3	210	17,7	330	15,9
	III	110	27,3	205	20,3	335	17,8
	III	95	21,1	194	18,4	320	21,0
31,25	IV	168	11,6	397	8,9	654	8,8
	II	79	20,6	118	17,8	184	16,1
	III	57	24,5	104	18,4	171	16,3

Moyennes ( $\bar{X}$ ), exprimées en millièmes de D.O., de 50 valeurs correspondant aux D.O. lues pour un même extrait de virus purifié dosé, déposé dans tous les puits d'une cuvette PAK. Trois essais pour chacune des 4 concentrations choisies.

Mean absorbances ( $\bar{X}$ ) of 50 values of O.D. recorded in all the wells of a PAK cuvette loaded with a purified virus preparation used at 4 concentrations (3 tests for each concentration).

et pour chaque ligne et chaque barrette d'une cuvette PAK. On remarque que les D.O. relatives aux puits des lignes A ou I sont, dans tous les cas, les plus élevées. Cet effet de « bordure » se manifeste aussi dans les cuvettes PAK pour la ligne 1. Généralement, les lignes médianes fournissent les

plus petites valeurs de D.O., créant ainsi un gradient de D.O. décroissantes depuis les bordures jusqu'au centre de l'unité de traitement, bien visible sur les graphiques de la figure 2. Occasionnellement, des différences importantes peuvent aussi apparaître entre les lignes médianes (fig. 1,

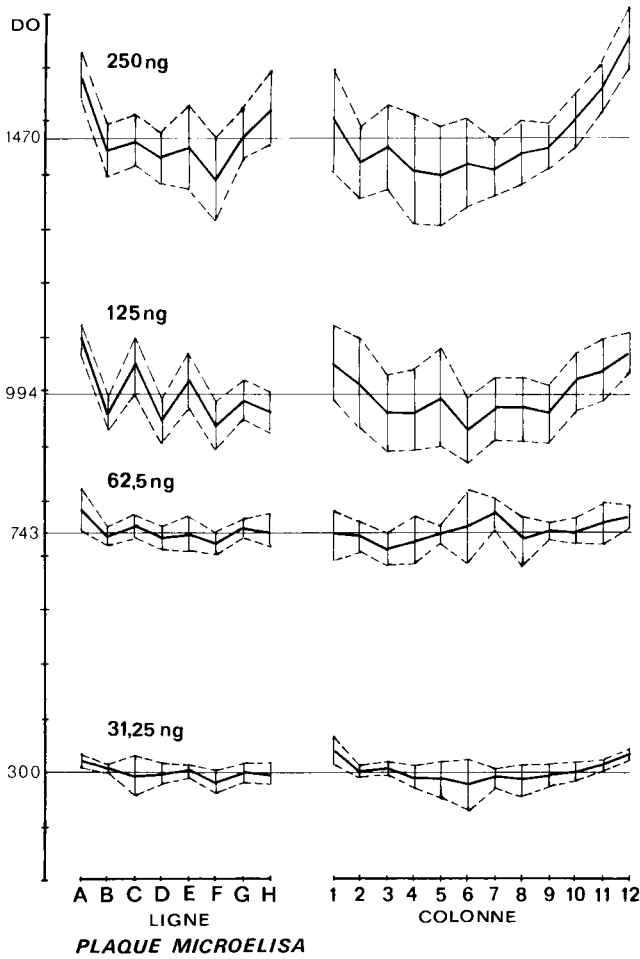


Figure 1  
Moyennes des D.O. lues dans les 12 puits de chaque « ligne » ou les 8 puits de chaque « colonne » d'une plaque MICROELISA, uniformément chargée avec une préparation dosée de CMV-D purifié (Quatre concentrations : 250, 125, 62,5 et 31,25 ng/ml ; résultats de l'essai 1 du tableau 1, après 60 mn d'incubation du substrat ; intervalle de confiance à P = 0,05).

Mean O.D. values recorded for the 12 wells of each "line" or the 8 wells of each "column" of a MICROELISA plate loaded with a purified CMV-D preparation (Four concentrations : 250, 125, 62.5 and 31.25 ng/ml ; data of test I, table 1 after 60 mn of substrate incubation ; confidence intervals 95 %).

pour 125 ng/ml). Dans les plaques, un phénomène de bordure apparaît également au niveau des colonnes 1 et 12.

Des analyses de variance à 2 critères, faisant intervenir les facteurs « ligne » et « colonne » (plaques MICROELISA) ou les facteurs « ligne » et « barrette » (cuvette PAK), montrent qu'en début d'incubation les rapports F sont dans presque tous les cas hautement significatifs au seuil 0,01 (à l'exception de 2 essais en cuvette PAK).

La prolongation de l'hydrolyse du substrat se traduit généralement par une baisse des valeurs de F sans pour autant supprimer le phénomène. Après 60 mn d'incubation en plaques, l'effet « colonne » est toujours significatif dans 6 cas et l'effet « ligne » dans 7 cas sur 8. Après 120 mn d'incubation en cuvettes PAK, les 2 effets « ligne » et « barrette » restent hautement significatifs dans 9 cas sur 12 (tabl. 3).

3. Utilisation de Δ D.O.

L'influence de la position des puits sur les valeurs de D.O. se manifeste dès le début de l'hydrolyse (tabl. 1 et 2). En

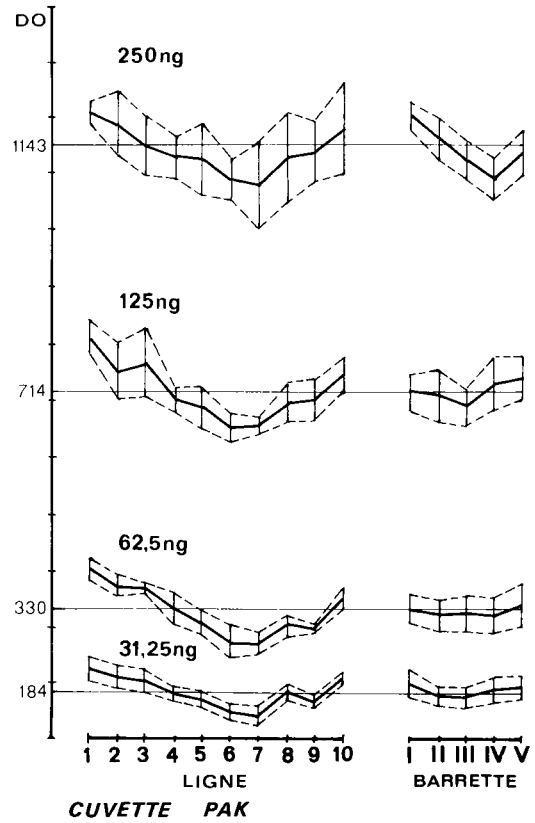


Figure 2  
Moyennes des D.O. lues dans les 5 puits de chaque « ligne » ou les 10 puits de chaque « barrette » d'une cuvette PAK, chargée avec une préparation dosée du CMV-D purifié (Résultats de l'essai II du tableau 2 après 1 h d'incubation du substrat ; autres modalités identiques à celles de la fig. 1).

Mean O.D. values recorded for the 5 wells of each "line" or the 10 wells of each "bar" of a PAK cuvette loaded with a purified CMV-D preparation. (Data of test II table 2 after 1 h of substrate incubation ; other details as in fig. 1).

tenant compte de ces variations précoces, on peut espérer minimiser le phénomène en utilisant non plus les D.O. brutes, lues après un certain temps d'incubation, mais les différences Δ D.O. obtenues en retranchant de ces valeurs celles enregistrées pour chaque puits, peu de temps après le dépôt du substrat.

En prenant en considération les Δ D.O. entre 15 et 60 mn d'incubation en plaques MICROELISA ou entre 30 et 120 mn en cuvettes PAK, on obtient des coefficients de variation qui sont du même ordre de grandeur que ceux des tabl. 1 et 2 calculés à partir des D.O. lues à 60 ou 120 mn. Mais les rapports de variance F, relatifs aux facteurs « ligne », « colonne » ou « barrette », sont globalement plus faibles que ceux indiqués sur le tableau 3. Toutefois, l'utilisation de Δ D.O. minimise mais n'élimine pas l'influence de la position des puits. Ainsi, dans le cas des plaques MICROELISA, l'effet « ligne » reste significatif dans 6 essais et l'effet « colonne » dans 5 essais sur les 8 analysés.

Le classement des moyennes de Δ D.O. correspondant à tous les puits d'une même ligne, d'une même colonne ou d'une même barrette confirme les phénomènes de bordure entrevus sur la figure 1.

Pour comparer entre elles les lignes, colonnes ou barrettes, nous leur avons attribué un *index de différenciation*, compris entre 0 et 1, calculé de la façon suivante : un test de NEWMANN & KEULS permet de déterminer pour chacune

TABLEAU 3

Influence de la position des puits sur les valeurs de D.O. Analyse de variance à 2 critères : facteurs « ligne » et « colonne » (plaque MICROELISA) ou « barrette » (cuvette PAK).

Influence of well position on O.D. values. Two-way analysis of variance : factor " row " and " column " (MICROELISA plates) or " bar " (PAK cuvettes).

Concentration (ng/ml)	Essai	Rapport de variance (F)			
		Plaque MICROELISA (1)		Cuvette PAK (2)	
		Facteur « ligne »	Facteur « colonne »	Facteur « ligne »	Facteur « barrette »
250	I	11,00 (**)	11,90 (**)	21,36 (**)	35,56 (**)
	II	19,77 (**)	8,26 (**)	15,23 (**)	32,42 (**)
	III			2,67 (*)	4,01 (**)
125	I	14,57 (**)	5,42 (**)	1,69 NS	9,16 (**)
	II	15,40 (**)	6,83 (**)	23,72 (**)	7,24 (**)
	III			49,15 (**)	6,19 (**)
62,5	I	2,69 (**)	1,71 NS	14,38 (**)	3,15 (*)
	II	4,54 (**)	1,81 NS	6,12 (**)	1,23 NS
	III			5,66 (**)	3,04 (*)
31,25	I	1,70 NS	3,63 (**)	1,53 NS	12,02 (**)
	II	13,27 (**)	5,28 (**)	40,12 (**)	8,80 (**)
	III			11,97 (**)	5,34 (**)

(1) Après 60 mn d'incubation du substrat.

(2) Après 120 mn d'incubation du substrat.

(\*\*) Hautement significatif au seuil 0,01 ; (\*) significatif au seuil 0,05 ; NS : non significatif.

d'elles le nombre de lignes, de colonnes ou de barrettes de la même plaque ou cuvette, dont la moyenne des  $\Delta$  D.O. leur est significativement différente. Ce nombre, divisé par le nombre total de lignes, colonnes ou barrettes moins 1 (soit par 7 pour les lignes, par 11 pour les colonnes et par 4 pour les barrettes), fournit l'index de différenciation.

Ces index ont été calculés pour tous les essais mentionnés sur le tableau 3 et les valeurs moyennes reportées sur la figure 3.

— Dans le cas des plaques MICROELISA, on remarque que la ligne A, la colonne 1 et, dans une moindre mesure la colonne 12 se distinguent nettement par un fort index de différenciation. Dans cet exemple, la ligne H, bien que située en bordure de la plaque, ne se démarque pas des lignes médianes. Nous serions donc amenés à supprimer préférentiellement les seuls puits de la ligne A et des colonnes 1 et 12. En pratique, on élimine tous les puits marginaux (ceux de la ligne H inclus), ce qui réduit à 60 le nombre des mesures possibles sur une plaque.

— Dans le cas des cuvettes PAK, la ligne 1 présente un index de beaucoup supérieur à tous les autres, y compris à celui de la ligne 10 située en bordure de la cuvette. En revanche, la comparaison des moyennes de  $\Delta$  D.O. relatives à chacune des 5 barrettes ne fait pas apparaître d'effet de « bordure » aussi marqué.

Lorsqu'on élimine tous les puits marginaux d'une plaque MICROELISA et les 5 puits de la ligne 1 d'une cuvette PAK, l'influence de la position des puits sur les valeurs de  $\Delta$  D.O. s'en trouve notablement réduite (tabl. 4). Avec les plaques, les C.V. sont nettement améliorés (inférieurs à 10 p. 100, sauf pour la concentration la plus faible). L'effet « ligne » n'est plus significatif que dans 4 essais et l'effet « colonne » dans 3 essais sur 8. Avec les cuvettes, les C.V. sont inférieurs à 10 p. 100 pour les 2 concentrations 250 et

125 ng/ml seulement. L'effet « ligne » reste significatif dans 9 essais sur 12 et l'effet « barrette » n'a pas été réduit.

A partir des valeurs de C.V. calculées, tant pour les plaques que pour les cuvettes, il est possible de déterminer le nombre de répétitions nécessaires pour obtenir une précision donnée.

Dans le cas des plaques MICROELISA, pour des concentrations en virus au moins égales à 62,5 ng/ml, il suffit de 3 répétitions pour que l'erreur relative soit inférieure à 20 p. 100. Dans le cas des cuvettes PAK, la même précision est obtenue avec 3 répétitions pour les 2 concentrations 250 et 125 ng/ml. Pour des concentrations en virus plus faibles, l'erreur relative reste inférieure à 30 p. 100 avec 3 répétitions pour les plaques et 4 répétitions pour les cuvettes.

#### 4. Utilisation de « triplets » (cuvettes PAK)

Lorsqu'on utilise les cuvettes PAK, la nécessité de faire au moins 3 mesures par échantillon réduit à 15 le nombre d'extraits analysés par cuvette. Au lieu d'effectuer les dépôts au hasard, nous avons recherché quelles seraient les associations de 3 puits (ou « triplets ») susceptibles d'engendrer la plus petite variation. Les puits de la ligne 1 ayant été éliminés, nous n'avons à étudier que les triplets obtenus en associant 3 par 3 les puits des lignes 2 à 10, soit 84 combinaisons. Pour chaque association, on calcule la moyenne des  $\Delta$  D.O. relatives aux 15 puits qui, dans une cuvette PAK, occupent les 3 lignes caractéristiques du triplet (ce qui minimise l'effet « barrette »). Ces moyennes sont alors classées par ordre de valeurs croissantes, ce qui permet d'attribuer à chaque triplet un numéro d'ordre correspondant à sa position par rapport au rang médian. Les résultats obtenus pour les 4 concentrations en virus choisies étant cumulés, les triplets sont ensuite classés selon un ordre de

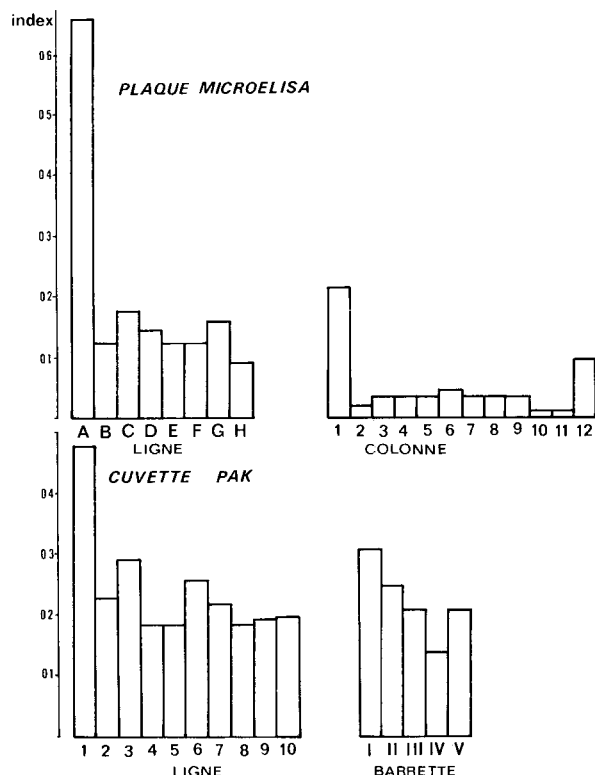


Figure 3  
 Comparaison des « index de différenciation » calculés pour chaque « ligne » et « colonne » d'une plaque MICROELISA et pour chaque « ligne » et « barrette » d'une cuvette PAK. Moyennes de tous les essais des tableaux 1 et 2.

Comparison of the "differentiation indices" calculated for each "line" and "column" of a MICROELISA plate and for each "line" and "bar" of a PAK cuvette. Mean values of all tests mentioned in tables 1 and 2.

préférence globalement valable pour la gamme 250-31, 25 ng/ml.

Les 15 triplets sont choisis parmi ceux ayant dans ce classement général les rangs les moins élevés, en tenant compte de la nécessité d'utiliser tous les puits des lignes 2 à 10 d'une cuvette. En outre, les 3 puits de chaque triplet sont choisis dans 3 barrettes différentes, selon un schéma que nous avons par la suite adopté dans tous nos essais. Dans ces conditions, on confirme que les coefficients de variation associés aux moyennes de  $\Delta$  D.O. de chaque triplet sont inférieurs à 10 p. 100.

**B. Etude de la corrélation « concentration-densité optique »**

1. Régression linéaire

Avec le conjugué d (8521), une préparation d'antigène CMV-D purifié, dosée à 500 ng/ml, donne une D.O. voisine de 1,8 après une incubation du substrat variant de 90 à 150 mn selon les essais et le support utilisé. Dans les mêmes temps, un extrait dosé à 15,6 ng/ml donne une D.O. d'environ 0,2. C'est donc dans cette gamme que nous avons recherché une corrélation entre la concentration en antigène et la densité optique.

Dans un système de coordonnées semi-logarithmiques où les log. des concentrations sont portés en abscisses et les D.O. en ordonnées, les valeurs correspondant aux 6 concentrations 500-250-125-62-31 et 15 ng/ml se placent sur une courbe en S qui s'infléchit légèrement aux extrémités (fig. 4). La pente générale de la courbe augmente au fur et à mesure que se poursuit l'incubation d'où l'intérêt de procéder à des lectures assez tardives si l'on désire que de faibles variations de concentration se traduisent par de fortes différences de D.O.

TABLEAU 4

Influence de la position des puits sur les valeurs de  $\Delta$  D.O. Valeurs comparées des moyennes ( $\bar{X}$ ), des coefficients de variation (Cv) et des rapports de variance (F) calculées sans tenir compte des puits situés en bordure de la plaque MICROELISA (60 valeurs) ou sans les puits de rang I de la cuvette PAK (45 valeurs).

Influence of well position on the values of  $\Delta$  O.D. Mean values of  $\Delta$  O.D. ( $\bar{X}$ ), coefficients of variation (Cv) and variance ratios (F) calculated without the outside row wells (60 values) of a MICROELISA plate, or without the wells belonging to the first row of a PAK cuvette (45 values).

Concentration (ng/ml)	Essai	Plaques MICROELISA (1)				Cuvette PAK (2)			
		Moyenne ( $\bar{X}$ ) (60 val.)	CV	Rapport F		Moyenne ( $\bar{X}$ ) (45 val.)	CV	Rapport F	
				ligne	colonne			ligne	barrette
250	I	1 122	5,3	5,05 (**)	7,59 (**)	1 251	6,5	10,6 (**)	21,62 (**)
	II	1 209	4,3	9,91 (**)	1,97 NS	671	4,3	2,81 (*)	25,95 (**)
	III					821	10,5	0,87 NS	4,15 (**)
125	I	797	7,5	6,09 (**)	2,35 (*)	1 300	3,9	6,97 (**)	37,43 (**)
	II	892	4,6	1,88 NS	1,43 NS	419	6,6	5,95 (**)	6,06 (**)
	III					441	8,3	22,42 (**)	7,94 (**)
62,5	I	506	4,9	0,46 NS	1,62 NS	193	13,3	7,21 (**)	2,87 (*)
	II	506	5,0	1,77 NS	2,89 (**)	215	11,8	18,38 (**)	8,76 (**)
	III					222	15,9	2,20 NS	1,96 NS
31,25	I	227	11,7	0,58 NS	1,69 NS	486	10,0	1,19 NS	19,87 (**)
	II	261	10,5	2,97 (**)	1,11 NS	102	13,7	18,78 (**)	4,95 (**)
	III					113	16,7	5,58 (**)	8,26 (**)

(1)  $\Delta$  D.o. (60-15 mn) ; (2)  $\Delta$  D.o. (120-30 mn).  
 (\*\*), (\*), NS = voir tableau 3.

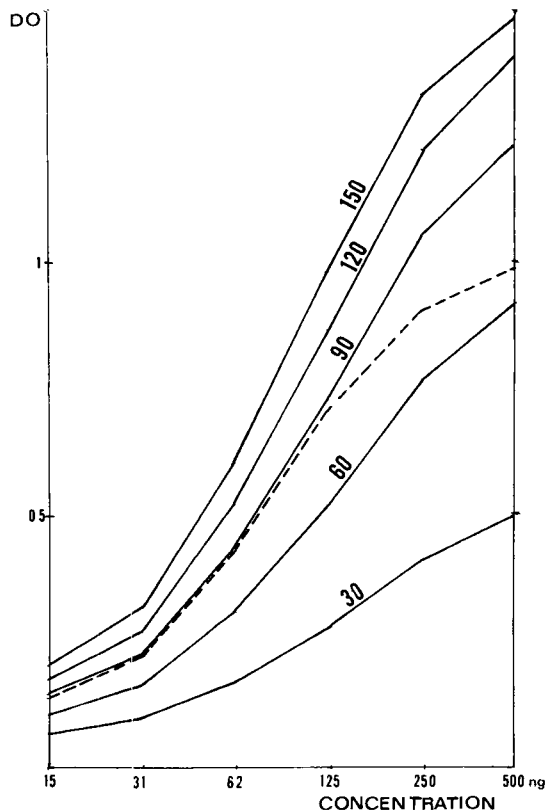


Figure 4

Evolution des D.O. enregistrées pour une préparation de CMV-D purifiée, stabilisée par le formaldéhyde (standard 907) entre 30 et 150 mn d'incubation du substrat (---)  $\Delta$  D.O. entre 30 et 150 mn. (Gamme de concentrations 500-15 ng/ml; moyennes de 6 mesures pour chaque concentration; analyse en cuvette PAK).

Change in O.D. recorded for a purified CMV-D preparation, stabilized with formaldehyde (standard 907) between 30 and 150 mn of substrate incubation (---)  $\Delta$  O.D.: 150-30 mn. (Concentration range: 500-15 ng/ml; means of six replicates for each concentration; performed in PAK cuvette).

Une étude de linéarité révèle que, le plus souvent, la portion de la courbe comprise entre 250 et 31,25 ng/ml peut être assimilée à une droite, au seuil de 0,01. Les droites de régression établies à partir de 24 valeurs de D.O. (150 mn) ou de  $\Delta$  D.O. (150-30 mn) situées dans cet intervalle sont représentées sur la figure 5. Les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,98 et 0,89. L'erreur commise en évaluant à partir de ces droites de régression, les teneurs théoriques en virus des 4 dilutions de l'extrait éprouvées, ne dépasse pas 10 p. 100.

Les résultats des tests de linéarité effectués avec différentes préparations de CMV-D ne sont pas toujours aussi satisfaisants. Quelques valeurs de F, calculées chacune à partir de  $\Delta$  D.O. (150-30 mn) correspondant à 4 (ou 3) concentrations en virus déposées dans une même cuvette PAK, sont indiquées sur le tableau 5. Dans la gamme 250-31,25 ng/ml, si l'on choisit le seuil 0,01, il y a bien linéarité pour les 4 concentrations dans 10 cuvettes sur les 11 analysées. Mais au seuil 0,05, elle n'apparaît que dans 7 cuvettes seulement. Dans 2 cas (essais II<sub>2</sub> et III<sub>1</sub>), il suffit d'éliminer les valeurs relatives à une concentration extrême pour retrouver la linéarité. On ne saurait pour autant généraliser. Pour 2 cuvettes en effet, il n'est pas possible d'établir une droite au seuil 0,05, quelles que soient les concentrations prises en considération; au seuil 0,01, il y a linéarité après élimination de la concentration 250 ng/ml dans un cas (IV<sub>2</sub>)

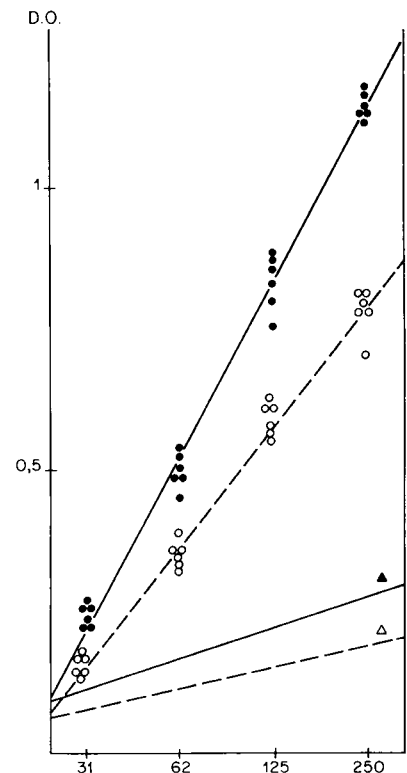


Figure 5

Droites de régression établies à partir de 24 valeurs de D.O. (ou de  $\Delta$  D.O.) correspondant à 4 concentrations de CMV-D purifié. Comparaison du même extrait (standard 2403) conservé 2 mois à 4°C, après avoir été ou non stabilisé par le formaldéhyde (analyse en cuvettes PAK).

Regression lines fitted to 24 O.D. (or  $\Delta$  O.D.) values recorded for four concentrations of purified CMV-D. Comparison of the same CMV-D preparation (standard 2403) stored two months at 4°C, without or after stabilization with formaldehyde (performed in PAK cuvettes).

- D.O. après 150 mn d'incubation.
- O.D. after 150 mn of incubation.
- $\Delta$  D.O. entre 30 et 150 mn d'incubation.
- $\Delta$  O.D. between 30 and 150 mn of incubation.
- (●, ○) — Extrait stabilisé.
- Stabilized preparation.
- (▲, △) — Extrait non stabilisé.
- Preparation without stabilization.

et après élimination de la concentration 31,25 ng/ml dans l'autre (IV<sub>1</sub>).

## 2. Reproductibilité intra-essai, entre cuvettes PAK

L'établissement de la droite de régression à partir de 4 dilutions du standard occupe 4 triplets (12 puits) d'une cuvette PAK, ce qui ne laisse que 11 triplets disponibles pour les extraits à doser. Dans un essai comportant plusieurs cuvettes, on pouvait penser qu'il ne serait pas nécessaire d'inclure un standard dans chacune d'elles. Le tableau 5 présente les résultats d'une étude de parallélisme des droites de régression calculées pour un même standard déposé dans plusieurs cuvettes.

Dans l'essai I, pour lequel il y a linéarité au seuil 0,05 dans 4 cuvettes, le test de parallélisme fournit une valeur de F non significative. On peut considérer que les 4 droites sont parallèles.

Dans les essais II, III et IV en revanche, il n'y a pas toujours linéarité au seuil 0,05. Pour l'essai IV, la valeur de F est même hautement significative dans la cuvette 2.

TABLEAU 5

Test de linéarité effectué à partir des  $\Delta$  D.O. (150-30 mn) relatives aux concentrations 250, 125, 62,5 et 31,25 ng/ml de CMV-D purifié et test de parallélisme des droites de régression calculées dans la gamme 250-31,25 ng/ml.

Linearity test (F) performed for  $\Delta$  O.D. (150-30 mn) within the concentration range 250-31,25 ng/ml. Parallelism test of the regression lines fitted from data recorded in several PAK cuvettes belonging to the same assay.

Essai	Cuvette	Test de linéarité			Droite de régression		Parallélisme	
		Gammes de concentrations			Pente	Ordonnée origine	F	Pente moyenne
		250-31,25	250-62,5	125-31,25				
I	1	0,595	—	—	444,07	- 1 434,51	0,290	483,19
	2	1,812	—	—	498,79	- 1 655,61		
	3	2,817	—	—	509,85	- 1 711,18		
	4	0,948	—	—	480,04	- 1 578,89		
II	1	3,626	—	—	386,84	- 1 197,72	0,105	386,12
	2	5,688 (*)	2,717	0,654	385,44	- 1 183,53		
III	1	6,117 (*)	2,004	1,476	395,37	- 1 126,19	1,615	413,92
	2	2,297	—	—	432,48	- 1 337,49		
IV	1	6,056 (*)	8,067 (*)	27,501 (*)	353,66	- 1 003,82	1,540	339,31
	2	9,059 (**)	16,334 (**)	9,067 (*)	336,92	- 939,31		
	3	0,912	—	—	327,35	- 902,17		

Malgré cela, les pentes des droites de régression établies à partir des 4 concentrations, ne sont pas significativement différentes.

### 3. Reproductibilité inter-essais (variation des standards)

La présence d'un standard dans chaque essai (ou mieux dans chaque cuvette PAK) devrait théoriquement remédier aux variations liées au support ou dues à une reproduction imparfaite de certaines conditions expérimentales difficiles à maîtriser. Mais il faut que les préparations de CMV-D utilisées comme standards soient elles-mêmes comparables ou, s'il s'agit du même extrait, que celui-ci ne se soit pas modifié en cours de conservation.

La stabilisation, par le formaldéhyde à 0,4 p. 100 est une condition impérative de la bonne conservation de l'antigène CMV-D purifié. En l'absence de formol, on assiste à une dégradation des virions qui, dans le cas d'un extrait conservé dans l'eau à 4°C, se traduit par une diminution apparente de la teneur en virus, telle qu'on peut l'évaluer par dosage spectrophotométrique.

En dépit d'un réajustement pondéral sur la base d'un coefficient d'extinction de 5, cet extrait donne en ELISA des valeurs de D.O. beaucoup plus faibles que celles fournies par la même préparation préalablement stabilisée par le formol (fig. 5). Grâce à cette stabilisation, certaines préparations de CMV-D purifié ont pu être conservées plus de 4 mois, sans accusé de perte sensible en spectrophotométrie ou de modification importante de leur comportement en ELISA.

On doit toutefois admettre que ce traitement modifie le comportement du virus en ELISA, comme en témoignent les réponses obtenues avec une préparation *fraîchement purifiée* (donc éprouvée avant toute dégradation éventuelle), stabilisée ou non par le formol (fig. 6). Dans cet exemple, bien que les 3 extraits aient été ramenés à la même concentration initiale (sur la base d'un dosage spectrophotométrique), la stabilisation occasionne en effet une baisse des valeurs de D.O. qui semble d'ailleurs dépendre de la concentration en formol utilisée. On constate que les

coefficients de corrélation sont cependant meilleurs pour les extraits stabilisés et que les droites de régression relatives aux 2 modalités de traitement sont parallèles.

Enfin, malgré l'adoption d'une méthode de stabilisation parfaitement définie (voir II Matériel et Méthodes), on constate que 2 préparations différentes de CMV-D stabilisées ne donnent pas toujours une réponse rigoureusement identique.

## IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Il est difficile de déterminer les causes exactes du manque de reproductibilité de la méthode ELISA, car de nombreux facteurs peuvent intervenir aux différentes étapes du test. La régularité des résultats dépend aussi du modèle étudié. Parmi les explications proposées, on peut toutefois retenir : (1) une adsorption beaucoup trop irrégulière des anticorps du « coating » ; (2) une mauvaise régulation des conditions d'hydrolyse du substrat.

Les récentes améliorations apportées à la fabrication de microplaques ou de cuvettes spécialement conçues pour le test ELISA ont sensiblement réduit l'hétérogénéité de réponse due à la qualité du polystyrène, mais des différences importantes subsistent entre des supports de diverses provenances. De plus, pour un support déterminé, le bon attachement des anticorps dépend aussi de leur concentration dans la préparation utilisée comme « coating ». Une teneur trop élevée, outre qu'elle engendre parfois une augmentation du bruit de fond, s'accompagne souvent de la libération d'anticorps mal fixés qui sont éliminés au cours des lavages (ENGVALL & PERLMANN, 1971b). Avec les 2 types de supports étudiés, nous avons employé une préparation d'immunoglobulines purifiées, dosée à 1 µg/ml, teneur qui se situe bien en deçà de leur capacité maximum d'adsorption. Malgré cela, dans les mêmes conditions expérimentales, les 2 supports ne donnent pas les mêmes résultats, ce qui nous a conduits à choisir, pour chacun d'eux, une durée d'hydrolyse différente.

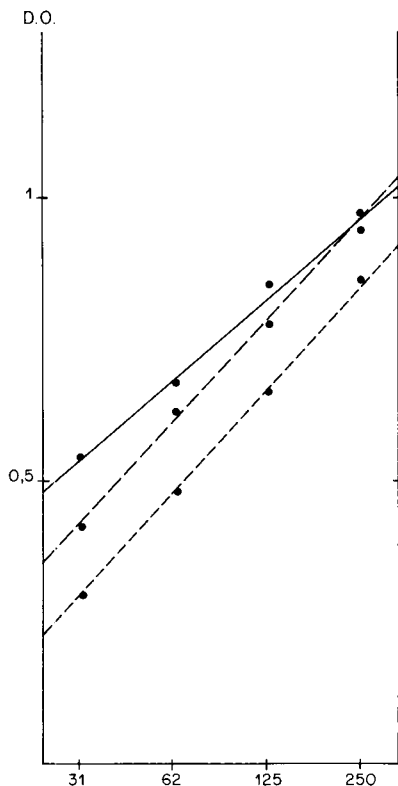


Figure 6

*Droites de régression établies à partir des D.O. enregistrées pour une préparation de CMV-D fraîchement purifiée, non stabilisée ou stabilisée par le formaldéhyde à 0,4 ou 1 p. 100 (standard 2204 ; gamme de concentrations : 250-31 ng ; analyse en cuvette PAK).*

*Regression lines fitted to data recorded for a freshly purified CMV preparation, without stabilization or stabilized with 0.4 or 1 % formaldehyde (standard 2204 ; concentration range 250-31 ng : performed in PAK cuvette).*

- (—) Préparation non stabilisée.  
Without stabilization.
- (---) Préparation stabilisée avec 0,4 p. 100 de formaldéhyde.  
Stabilized with 0.4 % formaldehyde.
- (.....) Préparation stabilisée avec 1 p. 100 de formaldéhyde.  
Stabilized with 1 % formaldehyde.

L'utilisation d'autres types de support (poudre de cellulose), auxquels les anticorps sont liés par des liaisons covalentes, permettrait probablement d'obtenir des « coating » plus homogènes. Ces supports n'ont pas été étudiés dans ce travail, leur emploi nécessitant des manipulations beaucoup plus laborieuses (surtout au cours des lavages) peu compatibles avec les exigences d'un test de routine.

Les variations des D.O. lues dans les différents puits d'une même plaque ou d'une même cuvette ne sont pas réparties au hasard. Il s'agit souvent d'un phénomène de bordure (CLARK & ADAMS, 1977 ; BURT *et al.*, 1979). Il ne semble pas que les différences dans les propriétés de surface du polystyrène soient à l'origine de ces variations, mais plutôt l'existence de gradients thermiques qui se créent au cours de l'hydrolyse du substrat (OLIVER *et al.*, 1981). Cette hypothèse est étayée, dans nos essais, par le fait que ces phénomènes n'intéressent pas toujours l'ensemble des puits marginaux, mais se localisent dans certaines zones de la plaque où leur intensité décroît graduellement de la périphérie vers le centre. BURT *et al.* (1979) ont insisté sur la nécessité d'une régulation très précise de la température qui conditionne étroitement la vitesse de la réaction enzymatique. Dans le souci d'une standardisation maximum des

conditions d'hydrolyse, nous avons placé les plaques et les cuvettes, non empilées, dans une étuve microbiologique suffisamment spacieuse pour éviter la proximité de parois, réglée à  $37 \pm 0,2$  °C, dans laquelle une importante humidité relative était constamment maintenue pour limiter l'évaporation. En dépit de ces précautions, on observe, d'un essai à l'autre, des variations notables de la vitesse d'hydrolyse, ce qui montre que tous les facteurs qui interviennent dans la réaction ne sont pas maîtrisés. Il est probable que des améliorations pourraient être apportées à ce stade : utilisation d'une étuve à circulation d'air forcée (OLIVER *et al.*, 1981), choix d'une température d'incubation plus basse (CLARK, 1981), emploi de réactifs conditionnés à la même température. Les résultats présentés ne sont peut-être pas les plus performants. Dans les conditions expérimentales que nous avons définies, ils montrent néanmoins dans quelle mesure et avec quelle précision on peut envisager un dosage.

L'élimination des puits marginaux est maintenant généralisée chez les utilisateurs de plaques MICROELISA. Bien que ces puits ne soient pas les seuls responsables, les résultats de cette étude confirment le bien-fondé de cette pratique qui permet d'améliorer sensiblement les coefficients de variation. Dans les cuvettes PAK, la variabilité est plus grande lorsque le virus est peu concentré, mais le choix de triplets permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec les plaques.

D'autres difficultés, tenant à la nature du modèle, sont apparues au cours de ce travail. Le virus de la mosaïque du concombre est un virus instable (VAN REGENMORTEL, 1967 ; KAPER & GEELLEN, 1971) dont certaines souches ont tendance à se dégrader plus ou moins vite au cours de leur conservation *in vitro*.

La nécessité de disposer d'une préparation stable de CMV qui puisse servir de standard dans plusieurs tests ELISA successifs, nous a contraints à travailler avec des antigènes stabilisés par le formaldéhyde. Ce traitement n'entraîne apparemment pas de modifications des propriétés antigéniques du virus lorsqu'on les analyse par immunodiffusion (FRANCKI & HABIL, 1972). Mais, au niveau d'un test ELISA, nous avons montré que la réponse de l'antigène (représentée par la droite de régression) s'en trouve modifiée. De plus, ces modifications semblent affecter plus ou moins les virions, ce qui se traduit par des différences assez sensibles d'une préparation à l'autre. Si l'étude entreprise nécessite plusieurs dosages, il est donc préférable d'utiliser comme standard la même préparation d'antigène stabilisé dont on aura déjà contrôlé le comportement au cours d'essais préalables. Souvent, les défauts de stabilisation se manifestent au début du stockage. En revanche, une préparation standard correctement stabilisée se conserve plusieurs mois.

Si la variabilité du test ELISA nous oblige à inclure un standard dans chaque essai, il ne semble pas indispensable de faire figurer celui-ci dans toutes les cuvettes d'un même essai, les droites de régression étant en général parallèles. On observe seulement un léger décalage de l'ordonnée à l'origine.

C'est grâce à la droite de régression établie à partir de plusieurs dilutions de la préparation standard que l'on pourra estimer, par comparaison, la teneur en virus d'un échantillon inconnu. Cette estimation peut se faire soit graphiquement, soit par le calcul, en utilisant l'équation de la droite. La gamme de concentration adoptée conditionne la zone dans laquelle on effectuera le dosage. Bien que l'on soit parfois tenté de restreindre cette zone, afin d'augmenter la précision de la méthode, il faut que celle-ci soit

suffisamment large pour que les D.O. lues pour un nombre limité de dilutions de l'extrait à doser s'inscrivent à l'intérieur de la zone choisie. Avec le modèle CMV, il y a linéarité au seuil 0,01, entre 250 et 31,25 ng/ml de virus purifié. Cela nous autorise à estimer correctement des teneurs en virus de 250 à 25 ng environ. Cette gamme, relativement restreinte, est du même ordre de grandeur que celle mentionnée par HARIRI & LAPIERRE (1979) pour le virus de la mosaïque modérée du dactyle. Elle est bien moins étendue que celle établie pour le virus de la mosaïque du tabac (DEVASH *et al.*, 1982) avec la méthode indirecte, ou pour le virus de l'enroulement de la pomme de terre (MEHRAD *et al.*, 1978).

Dans cette gamme, le dosage du CMV peut effectivement

être envisagé, à condition de respecter certaines modalités expérimentales strictes, que nous avons essayé de préciser (choix des puits, nombre de répétitions, calculs à partir de  $\Delta$  D.O.) sans lesquelles il serait assorti d'une grande imprécision due à la mauvaise reproductibilité de la méthode. Le principal avantage du test ELISA reste sa rapidité qui permet de l'utiliser pour un dosage de routine. Nous analyserons dans l'article suivant les conditions dans lesquelles on peut l'appliquer au dosage du CMV dans le melon et l'intérêt qu'il présente, en amélioration des plantes, pour le dépistage de lignées résistantes à la multiplication du virus.

Reçu le 7 février 1983.

Accepté le 14 septembre 1983.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Avrameas S., 1969, Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, **6**, 43-52.
- Avrameas S., Guilbert B., 1971. Dosage enzymo-immunologique de protéines à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes. *C.R. Acad. Sci., D, Paris*, **273**, 2705-2707.
- Burt S.M., Carter T.J.N., Bricka L.J., 1979. Thermal characteristics of microtiter plates used in immunological assays. *J. Immunol. Methods*, **31**, 231-236.
- Clark M.F., 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **19**, 83-106.
- Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**, 475-483.
- Devash Y., Biggs S., Sela T., 1982. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf disks is inhibited by 2'-5' oligoadenylate. *Science*, **216**, 1415-1416.
- Devergne J.C., 1974. A survey of the serological behaviour of CMV. Relationship between CVM strains and other viruses. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, **40**, 19-36.
- Devergne J.C., Cardin L., 1973. Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigénique. *Ann. Phytopathol.*, **5**, 409-430.
- Devergne J.C., Cardin L., 1979. Phénomènes d'interférence entre souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Répartition des antigènes viraux dans le *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. inoculé simultanément ou successivement par deux souches sérologiquement différentes. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 409-419.
- Devergne J.C., Cardin L., Pitrat M., Lecoq H., 1984. Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. II. Multiplication comparée du virus dans des melons sensibles et résistants. *Agronomie*, **4** (2), 137-145.
- Devergne J.C., Cardin L., Quiot J.B., 1978. Détection et identification sérologiques des infections naturelles par le virus de la mosaïque du concombre. *Ann. Phytopathol.*, **10**, 233-246.
- Douine L., Quiot J.B., Marchoux G., Archange P., 1979. Recensement des espèces végétales sensibles au virus de la mosaïque du concombre (CMV). Etude bibliographique. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 439-475.
- Engvall E., Perlmann P., 1971a. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- Engvall E., Perlmann P., 1971b. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, **109**, 129-135.
- Ferrua B., Vincent C., Revillard J.P., Pettazzi G., Maiolini R., Viot G., Masseyeff R., 1980. A sandwich method of enzyme immunoassay. III. Assay for human beta-2-microglobulin compared with radioimmunoassay. *J. Immunol. Methods*, **36**, 149-158.
- Francki R.I.B., Habili N., 1972. Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q-strain) by formaldehyde. *Virology*, **48**, 309-315.
- Hariri D., Lapierre H., 1979. Etude de la concentration d'une souche de virus de la mosaïque modérée du dactyle (VMMD<sub>B</sub>) dans le dactyle (*Dactylis glomerata* L.) et le blé (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Phytopathol.*, **11**, 251-258.
- Kaper J.M., Diener T.O., Scott H.A., 1965. Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. *Virology*, **27**, 54-72.
- Kaper J.M., Geelen J.L.M.C., 1971. Studies on the stabilizing forces of simple RNA viruses. II. Stability, dissociation and reassembly of cucumber mosaic virus. *J. Mol. Biol.*, **56**, 277-294.
- Lot H., Marrou J., Quiot J.B., Esvan C., 1972. Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II. Méthode de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.*, **4**, 25-38.
- Maiolini R., Masseyeff R., 1975. A sandwich method of enzyme immunoassay. I. Application of rat and human fetoprotein. *J. Immunol. Methods*, **8**, 223-234.
- Marco S., Cohen S., 1979. Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by enzyme linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, **69**, 1259-1262.
- Mehrad M., Lapierre H., Maury Y., 1978. Le virus de l'enroulement de la pomme de terre : purification, détection sérologique et dosage dans la plante. *C.R. Acad. Sc. Paris, D*, **286**, 1179-1182.
- Oliver D.A., Sanders A.N., Hogg R.D., Hellman J.W., 1981. Thermal gradients in microtiter plates. Effects on enzyme linked immunoassay. *J. Immunol. Methods*, **42**, 195-201.
- Quiot J.B., Devergne J.C., Marchoux G., Cardin L., Douine L., 1979a. Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le sud-est de la France. VI. Conservation de deux types de populations virales dans les plantes sauvages. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 349-357.
- Quiot J.B., Devergne J.C., Cardin L., Verbrugghe M., Marchoux G., Labonne G., 1979b. Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le sud-est de la France. VII. Répartition de deux types de populations virales dans les cultures sensibles. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 359-373.
- Scott H., 1963. Purification of cucumber mosaic virus. *Virology*, **20**, 103-106.
- Van Regenmortel M.H.V., 1967. Biochemical and biophysical properties of cucumber mosaic virus. *Virology*, **31**, 391-396.