

## Mise au point d'un test ELISA pour la détection d'un virus pathogène de la vigne

La pathogénicité du virus est liée à une protéine Pv pour laquelle des anticorps ont été obtenus chez la chèvre. On se propose de mettre au point un test ELISA de dosage de cette protéine dans des extraits de vigne afin d'en déterminer l'éventuelle contamination.

### 1. Réactifs

- une barrette de 16 puits dont la colonne 1 est utilisée pour la réaction et la colonne 2 pour les témoins. La barrette vous est fournie sensibilisée comme ci dessous :  
les cupules de la colonne 1 ainsi que les deux premières cupules de la colonne 2 (A2 et B2) ont reçu 200µL d'anticorps de sensibilisant anti Pv, la troisième cupule de la colonne 2 (C2) a reçu 200µL de tampon de sensibilisation.

- 50 mL de tampon PBS Tween noté PBS.T,
- 5 mL de tampon PBS Tween BSA, noté PBS.T.BSA,
- 1 mL de solution mère étalon Pv à 200 ng.mL<sup>-1</sup>,
- 2,5 mL de conjugué,
- 3 mL de solution de révélation enzymatique,
- 1 mL de soude 5 M.

### 2. Mode opératoire

Vider les cupules par retournement. Égoutter sur papier filtre.

Réaliser un lavage: ajouter dans chaque cupule 200µL de PBS Tween puis vider la microplaque par retournement et l'égoutter sur papier filtre.

Ajouter 200µL de PBS Tween BSA dans chaque cupule et couvrir d'un film autocollant. Incuber 15 min à 37°C.

Réaliser 4 lavages successifs par 200µL de PBS Tween dans chaque cupule.

Un extrait de vigne saine broyée et lavée a été chargé par une concentration connue de protéine Pv purifiée.

Réaliser, dans 7 tubes à hémolyse une gamme de concentrations décroissantes à partir de la solution mère à 200ng.mL<sup>-1</sup> par dilutions successives de raison 2. Le premier tube contiendra la première dilution au 1/2, le tampon de dilution étant le PBS Tween BSA, le volume final étant de 200µL.

Répartir dans la cupule A1 et éventuellement dans les cupules témoins 100µL de la solution mère. Dans les autres cupules sensibilisées de la colonne 1, introduire 100µL de chacune de ces dilutions.

Couvrir d'un film autocollant et incuber 45 min à 37°C.

Réaliser 4 lavages successifs par 200µL de PBS Tween dans chaque cupule.

Ajouter dans toutes les cupules réactions et éventuellement dans les cupules témoins, 200µL de conjugué.

Couvrir d'un film autocollant et incuber 45 min à 37°C.

Réaliser 5 lavages successifs par 200µL de PBS Tween dans chaque cupule.

Ajouter 200µL de solution de révélation (PNPP à 1 mg.mL<sup>-1</sup> en tampon glycine MgCl<sub>2</sub> pH = 10,5).

Couvrir d'un film autocollant et incuber 20 min à 37°C.

Arrêter la réaction par 50µL de solution de soude 5 M. Agiter manuellement. Essuyer le dessous de la microplaque et lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

### 3. Analyse du protocole et compte rendu

3.1. A l'aide d'un schéma, expliquer le principe de ce dosage. Préciser ses caractéristiques.

3.2. Le dosage de la protéine Pv peut être réalisé par une méthode CELIA en phase solide (méthode classique)

- 3.2.1. Définir le sigle CELIA;
- 3.2.2. Dresser la liste des différents réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'un tel dosage.
- 3.2.3. Schématiser en les différentes étapes en les expliquant.
- 3.3. Compléter la fiche jointe (plan de plaque ci composition des témoins). Expliquer alors le rôle des trois témoins A2, B2 et C2.
- 3.4. Présenter le tableau des résultats :
- Absorbances brutes ( $A_b$ ),
  - Absorbances nettes ( $A_n$ ) tenant compte des témoins.
- 3.5. Tracer sur papier millimétré la courbe :
- $$A_n (405 \text{ nm}) = f(\ln(\text{concentration en Pv en ng.mL}^{-1}))$$
- 3.6. Déterminer la concentration en Pv à partir de laquelle cette méthode de dosage n'est plus optimale. Déterminer le seuil de discrimination entre échantillons sains et infectés, sachant qu'il est défini comme la concentration en Pv correspondant à une absorbance égale à 2 fois celle du témoin le plus élevé.