



HAL
open science

Détection d'*Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* par le test Elisa après enrichissement bactérien

A. Nassar, J.P. Narcy, M. Lemattre

► **To cite this version:**

A. Nassar, J.P. Narcy, M. Lemattre. Détection d'*Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* par le test Elisa après enrichissement bactérien. *Agronomie*, 1996, 16 (3), pp.143-151. hal-02698667

HAL Id: hal-02698667

<https://hal.inrae.fr/hal-02698667v1>

Submitted on 1 Jun 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.

Détection d'*Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* par le test Elisa après enrichissement bactérien

A Nassar, JP Narcy, M Lemattre *

Unité de pathologie végétale, Inra, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles, France

(Reçu le 9 mars 1995; accepté le 2 février 1996)

Résumé — L'indexage des boutures d'œillet vis-à-vis d'*Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* (*Ech*) repose sur l'établissement d'un diagnostic fiable de la bactérie, en particulier dans les organes sans symptôme, faiblement infectés. La méthode Elisa mieux adaptée au traitement d'échantillons nombreux a été choisie. Avec le sérum polyclonal dont la spécificité est évaluée dans cet article, cette méthode permet d'identifier 5×10^3 bactéries.mL⁻¹. Différentes conditions d'incubation de l'échantillon à analyser en Das-Elisa sont étudiées de manière à multiplier *Ech* pour l'amener à une concentration supérieure à celle du seuil de détection établi. Les milieux LB et CVP permettent de multiplier rapidement la bactérie mais diminuent l'accrochage bactérie-anticorps au cours de la détection immunoenzymatique. L'incubation de l'échantillon dans l'eau physiologique à 30 °C permet, sans intervenir sur l'accrochage bactérie-anticorps, d'amplifier l'inoculum primaire. Le protocole d'analyse associant l'enrichissement et la technique Das-Elisa et son exploitation à grande échelle sont discutés sur le plan technique.

***Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* / œillet / enrichissement / Das-Elisa**

Summary — Detection of *Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola* (*Ech*) by the DAS-ELISA method in symptomless carnation cuttings. This method, using a polyclonal antiserum, the specificity of which was evaluated in this study, can detect up to 5×10^3 cfu.mL⁻¹. Different incubation conditions of carnation stem samples to be tested by DAS-ELISA were studied, in order to amplify the primary inoculum in weakly-infected symptomless samples. The aim was to increase the detection limits. The media LB and CVP, which ensure enrichment of *Ech* in samples, interfere with efficient antigen-antibody interaction. By contrast, incubation of samples in saline at 30 °C allows amplification without loss of antibody recognition. The exploitation of this method for routine analysis of carnation stem samples is discussed.

***E chrysanthemi* pv *dianthicola* / carnation / enrichment / DAS-ELISA**

INTRODUCTION

Le flétrissement et le nanisme bactérien (*Erwinia chrysanthemi* pv *dianthicola*) de l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L) décrit en Europe (Lelliott, 1956;

Hellmers, 1958; Bakker et Scholten, 1961; Bonnet, 1970), aux États-Unis (Dimock, 1958) et en Nouvelle-Zélande (Boesewinkell, 1973) est actuellement en recrudescence dans le bassin méditerranéen (Lercari, communication personnelle).

* Correspondance et tirés à part

alcaline selon Gorthier et al (1984), la concentration d'antigène minimale détectée (seuil de sensibilité) est obtenue avec une concentration en IgG de première couche de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et une dilution du conjugué au $1/8\ 000$. L'activité enzymatique est mesurée par l'absorbance (DO) à 405 nm au spectrophotomètre (Molecular Device). Chaque valeur correspond à la moyenne de trois répétitions.

Les tests sont effectués sur plaques de microtitration Greiner avec des dépôts de $200 \mu\text{L}$ par puits pour chaque étape. Les puits sont rincés avec du PBS-T entre les incubations.

Préparation des échantillons

Inoculation du matériel végétal

Des boutures non racinées d'œillet cv Kaly sont inoculées avant plantation par trempage dans une suspension bactérienne des souches 2021 et 30121 à la concentration de 10^6 bactéries. mL^{-1} en eau physiologique pendant 16 heures. Les témoins sont traités à l'eau physiologique.

Dispositif expérimental

Deux milieux d'enrichissement liquides sont utilisés pour l'incubation des prélèvements végétaux : le milieu complet LB et le milieu sélectif CVP (Crystal Violet Pectate, Cuppels et Kelman, 1974) qui privilégie la croissance des bactéries pectinolytiques à Gram-négatif. À ces milieux sont incorporés :

– soit l'inoculum calibré évalué par spectrophotométrie et confirmé par comptage (souches 2021 et 30121), avec et sans fragments de tige d'œillets sains ;

– soit des fragments de tige de plantes artificiellement infectées, âgées de deux mois et ne présentant pas de symptômes, prélevées deux mois après plantation, à 1 cm de la zone d'enracinement.

Les tiges désinfectées extérieurement, puis coupées en sections de 1 ou 5 mm, sont ensuite incubées à 4 et 30°C pendant 16 heures dans les milieux LB, CVP ou l'eau physiologique considérée comme témoin. Le rapport, poids de l'échantillon sur volume du milieu, est de $1/5$. Après incubation, le liquide dans lequel les bactéries ont diffusé est mélangé volume à volume au tampon PBS-T concentré deux fois.

RÉSULTATS

Les résultats portent sur quatre points :

Titre des trois immun-sérums obtenus

À la concentration de 10^4 bactéries. mL^{-1} , le titre des différents immun-sérums se situe à 10^{-5} en Acp-Elisa. Avec les sérums témoin (avant immunisation) et aux mêmes concentrations, aucune réaction positive n'est apparue. L'immun-sérum anti-2021 est le plus riche en anticorps (fig 2).

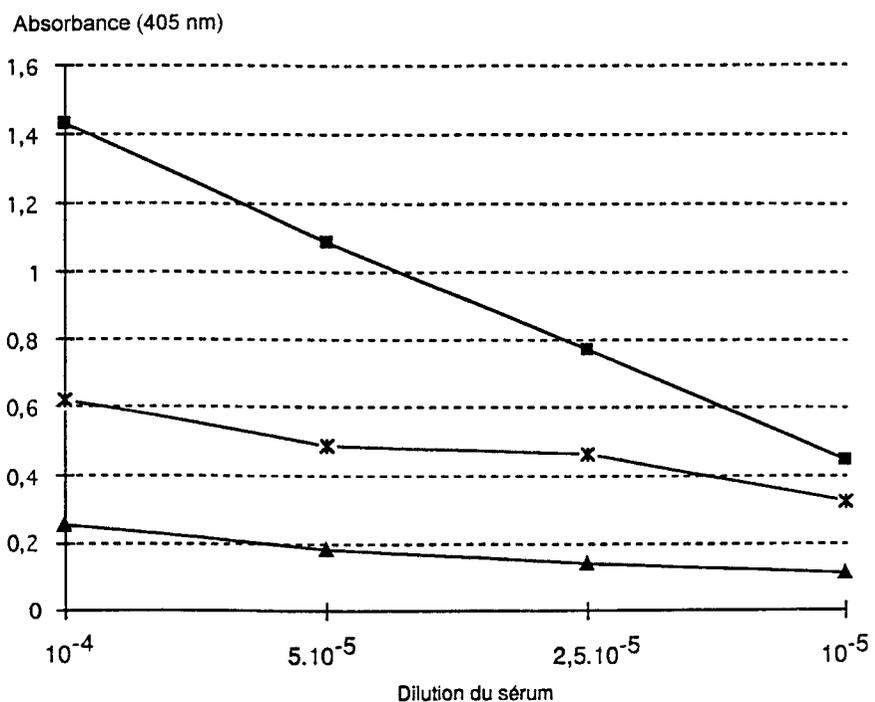


Fig 2. Comparaison en Acp-Elisa du prélèvement à la 30^e semaine des trois immuns sérums d'*E chrysanthemi*. Temps de réaction enzymatique : 1 heure. Antigènes utilisés à la concentration de 10^4 bactéries. mL^{-1} . —▲— sérum anti-1151, —✱— sérum anti-30121, —■— sérum anti-2021.

Tableau I. Spécificité du sérum anti-2021 en Das-Elisa.

<i>Souche</i>	<i>Plante hôte</i>	<i>Origine géographique et année d'isolement</i>	<i>Source^a</i>	<i>Réponse en Das-Elisa</i>
<i>E chrysanthemi</i>				
1871	Banane	Côte-d'Ivoire, 1976	1	-
1451		Colombie, 1972	1	-
1445		Colombie, 1972	1	-
1240	Œillet	Danemark, 1956	1	+
1243		Danemark, 1957	1	+
1985		France, 1972	1	+
2021 ^b		France, 1972	1	+
795		France, 1965	1	+
E1134		France, 1972	2	+
1151b		Italie, 1967	1	+
30119		Italie	3	+
30120		Italie	3	+
30121 ^b		Italie	3	+
30122		Italie	3	+
1200		Royaume-Uni, 1956	1	+
PD 863		Royaume-Uni, 1956	4	+
1441		États-Unis	1	+
3262	Endive	France, 1981	1	+
SF18-538		Suisse	2	+
3263		France, 1982	1	+
3265		France, 1983	1	+
3266		France, 1983	1	+
2048	Chrysanthème	États-Unis, 1956	1	+
1242		États-Unis	1	+
1529	Maïs	États-Unis	1	+
3367	Dahlia	France, 1977	3	+
2013		France, 1974	1	+
30332		France, 1977	3	+
3642	Dieffenbachia	France, 1974	3	+
1237		Allemagne, 1962	1	+
1345		Italie, 1969	1	+
3716	Kalanchoë	France, 1978	3	+
2598		Suisse, 1982	1	+
1443	Syngonium	États-Unis, 1972	1	+
1272	Ananas	Malaisie, 1961	1	-
2711	Pomme de terre	Australie	1	-
1888		France, 1978	1	+
2288		France, 1980	1	+
Cip 366		Pérou	6	+
2268		Australie, 1978	1	-
30920	Saintpaulia	France, 1977	3	+
722	Tomate	France, 1965	1	+
ET 11		Martinique, 1988	5	+
<i>E carotovora carotovora</i>				
40329	Cyclamen	France, 1984	3	-
40990	Primevère	France, 1982	3	-
<i>E carotovora atroseptica</i>				
40501	Pomme de terre		3	-
40884	Endive	France, 1982	3	-
<i>Pseudomonas syringae pv pisi</i>				
1436	Pois	France, 1973	1	-
<i>Pseudomonas syringae pv phaseolicola</i>				
20401	Haricot		3	-

Tableau I. Cont.

Souche	Plante hôte	Origine géographique et année d'isolement	Source ^a	Réponse en Das-Elisa
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i> 1147	Poirier	France, 1965	1	–
<i>Pseudomonas caryophylli</i> 2429	Œillet	États-Unis	1	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2102 2125	Eau	Royaume-Uni, 1951	1	–
<i>Pseudomonas corrugata</i> 2431	Tomate	Royaume-Uni	1	–
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> 528			7	–
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i> 1816	Haricot		1	–
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>oryzicola</i> 2286	Riz	Malaisie, 1964	1	–
<i>Xanthomonas albilineans</i> 15003	Canne à sucre	Guadeloupe	5	–
<i>Xanthomonas fragariae</i> 2473	Fraisier	États-Unis, 1966	7	–
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 60101		France	3	–

^a Code des sources de culture : 1 = Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), Inra, Angers, France ; 2 = R Samson, Inra, Angers, France ; 3 = M Lemattre, Inra, Versailles, France ; 4 = Culture Collection Plant Pathogenic Service, Wageningen, Pays-Bas ; 5 = Irat-Cirad, Martinique, France ; 6 = B Jouan, Inra, Rennes, France ; 7 = NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, Royaume-Uni. ^b Souches utilisées en immunisation.

Spécificité de l'immun-sérum anti-2021

L'immun-sérum anti-2021 ne reconnaît aucune des souches appartenant aux espèces et genres autres qu'*E chrysanthemi*, notamment *Pseudomonas caryophylli*, bactérie pathogène de l'œillet, de même qu'aucune des 28 souches de la flore épiphyte isolée d'œillet.

Toutes les souches d'*E chrysanthemi* sont reconnues, exceptées celles isolées de banane, ananas et deux souches isolées de pomme de terre, qui diffèrent par leurs profils ARNr et PCR-RFLP (Nassar et al, 1994).

Toutes les souches isolées d'œillet sont identifiées. Ces résultats sont présentés au tableau I.

Sensibilité du test Das-Elisa

Le seuil de sensibilité évalué sur suspension bactérienne étalonée se situe à 5×10^3 bactéries.mL⁻¹ dans le tampon PBS-T avec et sans fragments de tige d'œillet (fig 3).

Intérêt et limite de l'enrichissement

Enrichissement obtenu sur les milieux LB et CVP

Après 16 heures d'incubation à 30 °C, l'accroissement de l'inoculum primaire (10^4

Tableau II. Taux d'enrichissement de l'inoculum primaire (B), sur deux milieux, LB et CVP, à 30 °C en présence d'échantillons végétaux (EV). Témoin eau physiologique (H₂O) à 4 °C.

Milieu d'enrichissement	Inoculum initial (bac.mL)	Inoculum final (bac/mL)	Taux d'enrichissement
H ₂ O + B à 4 °C	10 ⁴	10 ⁴	1
H ₂ O + B à 30 °C	10 ⁴	1,5 x 10 ³	0,8
H ₂ O + B + EV à 30 °C	10 ⁴	8 x 10 ⁵	80
LB + B + EV à 30 °C	10 ⁴	3 x 10 ⁷	3 000
CVP + B + EV à 30 °C	10 ⁴	2 x 10 ⁷	2 000

Dénombrement des bactéries par dilutions-étalements (moyenne de trois répétitions).

bactéries.mL⁻¹), dans les deux milieux de culture et l'eau physiologique, additionnés de fragments végétaux est évalué par comptages après étalement sur milieu gélosé (tableau II).

Ils montrent que l'enrichissement de la population bactérienne initiale dans le milieu LB est supérieur à celui obtenu dans le milieu CVP. En eau physiologique, à 30 °C comme à 4 °C, l'accroissement de l'inoculum en l'absence de tissus végétaux est nul, en revanche, à 30 °C, la bactérie se multiplie lorsque les fragments de plante hôte sont présents.

Influence de la composition du milieu sur l'accrochage bactérie-anticorps

En conditions de température défavorables à la multiplication bactérienne (4 °C), après

16 heures d'incubation des bactéries en présence des tissus d'œillet, on constate que les métabolites diffusés par ces derniers jouent un rôle dépressif sur l'accrochage bactérie-anticorps (séries 1 et 2) (fig 4). Cet effet diminue avec la dilution du liquide de diffusion (série 2).

En conditions d'incubation favorables à la multiplication des bactéries (30 °C), l'effet négatif des métabolites d'origine végétale ou bactérienne sur l'accrochage bactérie-anticorps est confirmé (série 3).

Si l'on compare les séries 3, 4 et 6, il apparaît que c'est après incubation dans le milieu CVP que l'accrochage est le plus faible, alors qu'il se situe au même niveau dans le milieu LB et l'eau physiologique. L'effet s'atténue là aussi après dilution du liquide de diffusion.

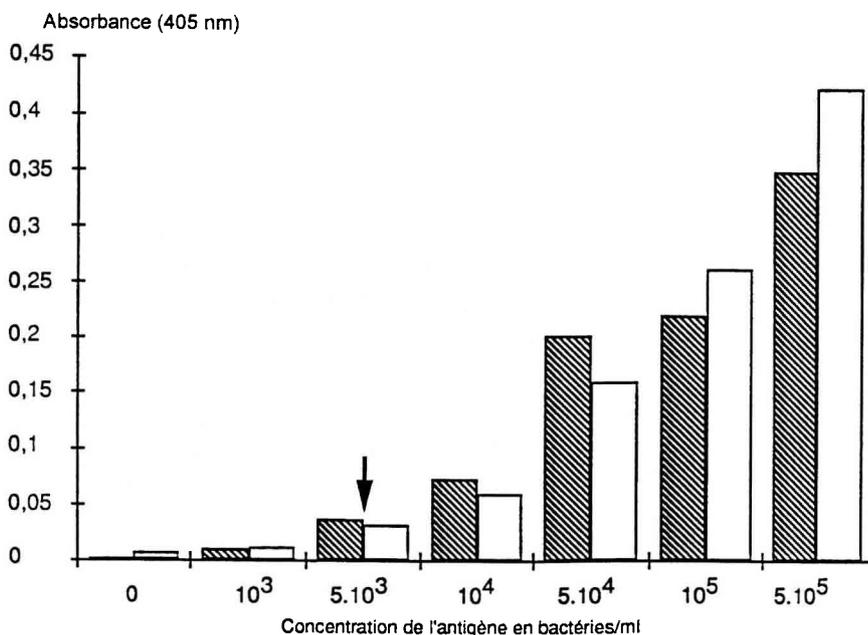


Fig 3. Limite de détection d'*E chrysanthemi* (souche 2021) en Das-Elisa en présence et en absence d'échantillon végétal. Sérum anti-2021; temps de réaction enzymatique : 1 heure. ▨ = suspension bactérienne calibrée dans le PBS-T; □ = bactéries incorporées dans le PBS-T en présence d'échantillons végétaux incubés 16 heures à 4 °C; ↓ = seuil de détection.

Détection sur plantes infectées artificiellement

L'incubation 16 heures à 30 °C dans l'eau physiologique des fragments de tige de plantes de 2 mois issues des boutures infectées avant bouturage permet une augmentation sensible de la population bactérienne initiale (fig 5). Les valeurs d'absorbance des liquides de diffusion témoin, maintenus à 4 °C, sont sensiblement égales à celles des dilutions au 1/100 de ceux incubés à 30 °C. Autrement dit, à la température optimale de croissance, l'inoculum initial est multiplié par 100 sans autres sources nutritionnelles que celles des tissus de l'œillet.

DISCUSSION

L'immun-sérum utilisé au cours de ce travail permet d'identifier les souches d'*Ech* pathogènes de l'œillet, qu'elles appartiennent ou non au pv *dianthicola*.

Les données présentées montrent l'intérêt d'une incubation préalable des fragments de tige à analyser (fig 5), de manière à permettre à l'inoculum bactérien initial des plantes de diffuser hors des tissus et de se multiplier dans la phase liquide pour atteindre le seuil de détection en Das-Elisa. L'incubation en eau physiologique permet d'assurer l'identification d'inoculum très faibles situés en dessous du seuil de détection en Das-Elisa (5×10^3 bactéries.mL⁻¹). Bien que l'enrichissement soit plus important avec le milieu complet (LB) et le milieu sélectif des germes pec-

tinolytiques (CVP), les inconvénients introduits par leur utilisation au niveau de l'accrochage bactérie-anticorps limitent pourtant leur intérêt par rapport à l'eau physiologique.

Le milieu CVP, reconnu pour sa sélectivité dans des études de population d'*E carotovora* (Pérombelon et Kelman, 1980), permet une croissance légèrement moindre d'*E chrysanthemi* que le milieu non sélectif LB ; en revanche, il limite davantage la croissance des germes saprophytes (Pérombelon et Hyman, 1986). Toutefois ces germes qui ne sont pas reconnus par l'immun-sérum utilisé ne devraient pas avoir d'incidence sur l'interprétation des résultats en Elisa. En outre, dans le protocole choisi, la flore saprophyte polluante a été éliminée par la désinfection préalable du fragment végétal, ce qui explique son absence ou sa très faible présence sur les ensemencements réalisés. Par ailleurs, le choix de plantes cultivées en serre sur substrats inertes et de stades précoces d'infection contribuent à limiter l'expression de la flore bactérienne. La présence de ces germes qui pourraient limiter la croissance des souches d'*Ech* n'a pas été confirmée sur les prélèvements effectués après incubation de l'échantillon lors du comptage des colonies bactériennes.

Si l'on compare l'incidence de la composition du milieu, en particulier celle du témoin eau physiologique sur l'accrochage bactérie-anticorps, le choix du milieu d'incubation doit être reconsidéré au profit d'une phase liquide simple (eau physiologique), puisque la bactérie peut se multiplier en puisant les sources nutritionnelles nécessaires à

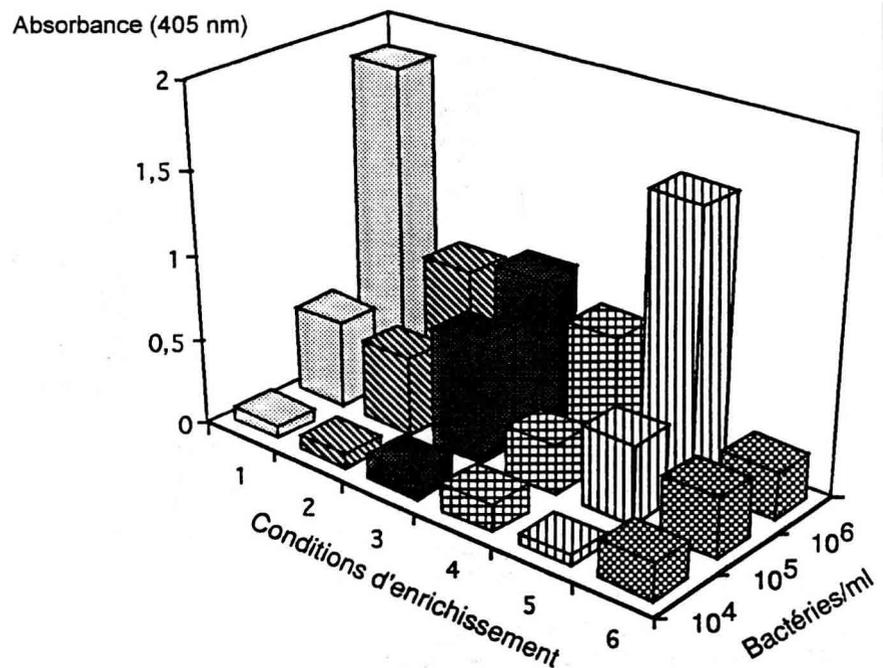


Fig 4. Effet du milieu d'enrichissement sur l'accrochage des bactéries (souche 2021) en Das-Elisa. Sérum anti-2021; temps de réaction enzymatique : 30 minutes. Bactéries (AG) apportées à la concentration finale de 10^6 bactéries.mL⁻¹. 1 AG en eau physiologique 16 heures à 4 °C ; 2 AG en eau physiologique 16 heures à 4 °C et en présence d'échantillons végétaux ; 3 AG en eau physiologique incubé 16 heures à 30 °C en présence d'échantillons végétaux ; 4 AG en milieu LB incubé 16 heures à 30 °C en présence d'échantillons végétaux ; 5 AG dans les conditions précédentes mais lavés par centrifugation pour éliminer le milieu ; 6 AG en milieu CVP incubé 16 heures à 30 °C en présence d'échantillons végétaux.

Absorbance (405 nm)

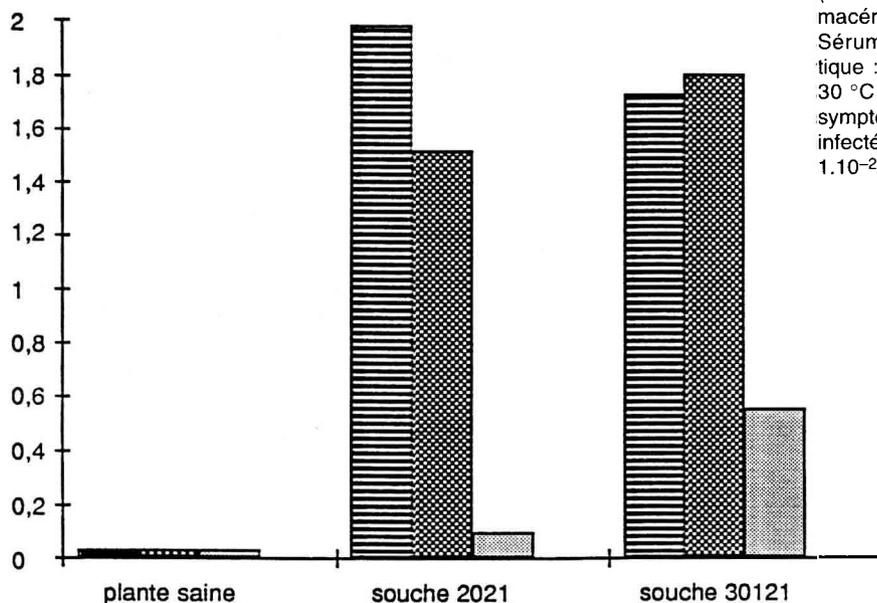


Fig 5. Détection en Das-Elisa d'*E chrysanthemi* (souches 2021 et 30121) sur plantes malades macérées 16 heures dans l'eau physiologique. Sérum anti-2021; temps de réaction enzymatique : 2 heures. ■ Macération de tiges saines à 30 °C; ▨ macération de tiges infectées sans symptôme à 4 °C (témoin), macération de tiges infectées sans symptôme à 30 °C; ▩ diluée au 1.10^{-2} ; ▪ diluée au 1.10^{-3} .

sa croissance à partir des fragments végétaux. Il serait intéressant, pour l'analyse d'échantillons présentant des symptômes, d'évaluer l'incidence des métabolites diffusés lorsque les tissus sont fortement dégradés. En revanche, pour le contrôle sanitaire des organes de multiplication, choisis sur des plantes d'apparence saine, cette éventualité peut être écartée.

Le choix de fragments résulte d'observations antérieures, montrant que la dilacération ou le broyage de l'échantillon accroissent le bruit de fond en Elisa. Ce procédé réduit en outre le temps de préparation et donc le coût de l'opération.

Les résultats présentés devront être validés sur du matériel naturellement infecté. Cependant, la maladie n'étant jamais généralisée, tous les organes d'un pied mère infecté ne sont pas systématiquement colonisés. Ce matériel paraît donc mal approprié pour conclure sur la présence ou l'absence de la bactérie dans le pied mère.

RÉFÉRENCES

- Avrameas S, Guilbert B (1971) Dosage enzymo-immunologique des protéines à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes. *C R Acad Sci Ser D* 273, 2705-2707
- Bakker M, Scholten G (1961) Bacteri-eziekten bij Amerikaanse Anjers in Nederland. *Tijdschr Plantenziekten* 67, 296-302
- Boccaro M, Vedel R, Lalo D, Lebrun MH, Lafay JF (1991) Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant-Microbe Interact* 4, 293-299
- Boesewinkel HJ (1973) Bacterial wilt of carnation in New Zealand. *Plant Dis Rep* 57, 136-140
- Bonnet P (1970) Étude comparée des caractères biochimiques du *Pectobacterium parthenii* (Starr) Hell var *Dianthicola* (Hell) et de différentes souches de *Pectobacterium*, d'*Aerobacter* et de *Serratia*. *Ann Phytopathol* 2, 209-225
- Cuppels D, Kelman A (1974) Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64, 468-475
- Devergne JC, Cardin L, Bontemps J (1982) Indexages biologique et immunoenzymatique (Elisa) pour la production d'œillets indemnes de virus de la marbrure (CarMV). *agronomie* 2, 655-666
- Dimock AW (1958) Reports on carnation disease. *Carnation Craft* 43, 1-5
- Gorthier G, Boschetti E, Charley-Poulain J (1984) Improved method for IgG purification from various animals species by ion-exchange chromatography. *J Immunol Methods* 66, 75-79
- Goumas D, Lemattre M, Narcy JP, Albouy J, Larroque N (1986) Detection of bacteria and virus in dahlia by immuno-enzymatic tests. *Acta Horticult* 177, 115-120
- Hellmers E (1958) Four wilt diseases of perpetual flowering carnation in Denmark. *Danak Botan Arkiv* 18, 1-200
- Lamka GL, Hill JH, McGee DC, Braun EJ (1991) Development of an immunosorbent assay for seed-borne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology* 81, 839-846
- Lelliott RA (1956) Slow wilt of carnations caused by a species of *Erwinia*. *Plant Pathol* 56, 19-23
- Mercier S, Pionnat JC, Tramier R (1967) Recherches sur le flétrissement bactérien de l'œillet dû au

- Pectobacterium parthenii* var *dianthicola* (Hellmers). *Phytiatr Phytopharm* 16, 149-156
- Muratore MG, Mazzucchi U, Gasperini C, Fiori M (1986) Detection of latent infection of *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas caryophylli* in carnation. *Bull OEPP* 16, 1-12
- Nassar A, Bertheau Y, Dervin C, Narcy JP, Lemattre M (1994) Ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* strains in relation to their pathogenic and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 60, 3781-3789
- Perombelon MCM, Kelman A (1980) Ecology of the soft rot erwinias. *Annu Rev Phytopathol* 18, 361-387
- Perombelon MCM, Hyman LJ (1986) A rapid method for identifying and quantifying soft rot erwinias directly from plant material based on their temperature tolerances and sensitivity to erythromycin. *J Appl Bacteriol* 60, 61-66
- Philippot P, Narcy JP, Berthier Y, Lemattre M (1990) Mise au point d'un test immunoenzymatique pour la détection de *Xanthomonas campestris* pv *begoniae*. In : 2^e Congrès SFP, Montpellier, 1 p
- Tsuchiya K, Takahashi Y, Shohara K, Homma Y, Suzui T (1991) Rapid and simple ELISA procedure for the specific detection of *Pseudomonas cepacia* in soil. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 57, 196-202
- Van Vurde JWL (1987) New approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. *Bull OEPP* 17, 139-148
- Vollera A, Bidwell DE, Bartlett A (1976) *Microplate enzyme immuno assays for the immuno diagnosis of virus infections*. Manual of Clin Immuno. ASM, Washington, DC, 506-512