

Développement éclair de nouveaux outils de diagnostic pour l'agronomie

Christophe Debonneville, Jean-Sébastien Reynard, Olivier Schumpp et Santiago Schaerer
Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Christophe Debonneville, e-mail: christophe.debonneville@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 43 71



Purification des anticorps recombinants sélectionnés par *Phage Display*.

Face à l'émergence constante de nouvelles maladies ou de souches virales, bactériennes et fongiques, il est nécessaire de pouvoir développer, dans les plus brefs délais et à faible coût, de nouveaux outils de diagnostic. La méthode dite du *Phage Display* permet l'isolation de nouveaux anticorps de manière rapide et fiable, tout en permettant d'analyser un large spectre de cibles dans les domaines phytosanitaire, vétérinaire ou même agroalimentaire. Un exemple de cible est présenté ci-dessous avec le virus de la petite cerise.

Introduction

L'excellence de l'agriculture en Suisse repose largement sur la science et l'innovation technologique. Dans le domaine de la protection végétale, le développement scientifique contribue de manière importante au diagnostic rapide et précis des maladies infectieuses pour choisir les moyens de lutte les plus efficaces. La découverte de la méthode de détection immunologique par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, fig. 1) et

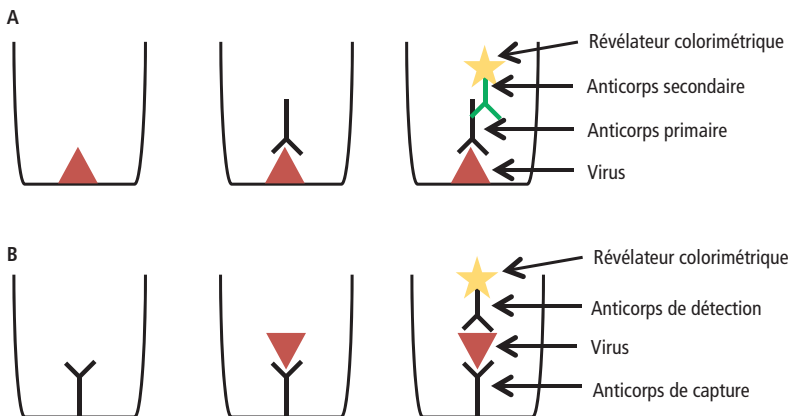


Figure 1 | Représentation schématique de la méthode ELISA.

A: ELISA «indirect»: le virus est immobilisé sur une surface solide, puis un anticorps primaire est appliqué pour le détecter. Un anticorps secondaire conjugué permet la révélation des échantillons (changement de couleur pour les échantillons positifs).

B: ELISA «sandwich double-anticorps» (DAS): l'anticorps de capture est immobilisé sur une surface solide puis l'échantillon est appliqué. Un anticorps de détection conjugué permet la révélation des échantillons (changement de couleur pour les échantillons positifs).

son adaptation au diagnostic sur des plantes cultivées (Clark et Adams 1977) ont été des étapes déterminantes. Depuis plus de 30 ans, l'application de la méthode dans les filières de certification de plants de culture (Gugerli 1978) garantit la qualité de plusieurs types de cultures majeures, produites et vendues en Suisse.

Avec l'intensification des échanges entre pays du globe, l'augmentation de la législation et des contrôles et l'émergence de nouvelles maladies, les besoins en

nouveaux outils de diagnostic explosent. Le diagnostic immunologique de type ELISA et par immuno-chromatographie sur bandelette restent les outils les plus utilisés. Comparée aux méthodes de diagnostic moléculaire basées sur la spécificité génétique des souches pathogènes, l'analyse immunologique est moins coûteuse et peut être utilisable par des non-spécialistes, comme des producteurs et des particuliers (De Boer et Lopez 2012). Pour ces mêmes raisons, elle conserve tout son intérêt >

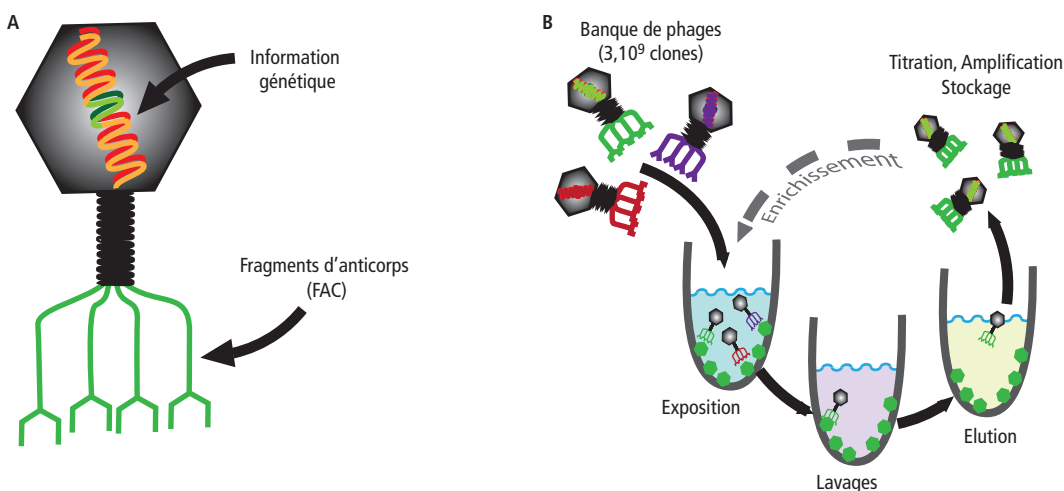


Figure 2 | **A:** Particule de phage filamentueux contenant l'ADN modifié qui permet l'expression du fragment d'anticorps à sa surface (génotype lié au phénotype).

B: Cycle de sélection-amplification du *Phage Display*. La cible d'intérêt est immobilisée sur une surface solide, puis exposée à la banque de phages. Après lavages, les phages se liant à la cible sont élués, titrés puis amplifiés. Après 2 à 4 tours de sélection, les fragments d'anticorps sont analysés pour les propriétés recherchées.



Figure 3 | Cerises saines (gauche) ou atteintes par le virus de la petite cerise (droite). (Photo: ACW)

pour les analyses à haut débit dans le cadre des processus de certification de plants. Le diagnostic immunologique en agriculture repose sur la production d'anticorps spécifiques, ciblant les agents causaux des maladies.

Au sein d'Agroscope, le groupe de virologie et phytoplasmiologie développe en permanence de nouveaux anticorps pour la détection de maladies, nouvelles ou émergentes, qui frappent les cultures en Suisse. La technologie dite du *Phage Display* présentée ci-dessous est habituellement réservée au domaine thérapeutique et au diagnostic médical. En l'adaptant aux besoins agronomiques, il est possible de produire rapidement et à faible coût de nouveaux anticorps hautement spécifiques de type monoclonal.

La technique du *Phage Display*

Le développement d'un nouvel anticorps monoclonal est un procédé complexe. Plusieurs méthodes ont été utilisées à ce jour avec succès, notamment la production d'hybridomes et la technique du *Phage Display*. Avec cette dernière, des peptides exogènes (dans notre cas, un fragment d'anticorps ou FAC) sont exprimés à la surface d'un bactériophage filamenteux et peuvent être présentés à des cibles diverses (fig. 2A). Ceci permet d'imiter *in vitro* la sélection naturelle des immunoglobulines. Le point de départ est généralement un grand répertoire, très diversifié, de particules de phages (appelé banque et contenant 10^6 à 10^{10} candidats diffé-

rents). Ce répertoire est exposé à la cible d'intérêt afin d'identifier et d'isoler les candidats qui s'y lient (fig. 2B). Les phages produisant les FAC ainsi isolés sont ensuite amplifiés et sélectionnés à nouveau contre la même cible. Après 2 à 4 tours de sélection et d'amplification, les candidats sont testés pour l'activité recherchée, principalement par ELISA. Cette stratégie basée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique (utilisant la culture cellulaire), qui nécessite beaucoup plus de temps et de moyens. Il est en effet possible de cribler 10^6 à 10^{10} candidats différents dans un tube au laboratoire, un nombre qui serait impossible à atteindre en cultivant des cellules selon le protocole de la méthode traditionnelle. En outre, l'association du phénotype (fragment d'anticorps exprimé à la surface du phage) avec son génotype (ADN codé par le phage) permet d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées. Grâce à cette méthode efficace, il est possible de sélectionner un phage spécifique dans la banque originale. L'accès à l'information génétique permet également une étape postérieure d'optimisation en manipulant par exemple la séquence d'ADN à des endroits précis par mutagenèse ciblée, afin d'améliorer l'affinité des fragments d'anticorps sélectionnés.

Des exemples d'anticorps monoclonaux développés grâce à cette technologie existent dans le domaine médical (Geyer *et al.* 2012; Hairul Bahara *et al.* 2013) ainsi qu'en virologie végétale (Ziegler *et al.* 1995).

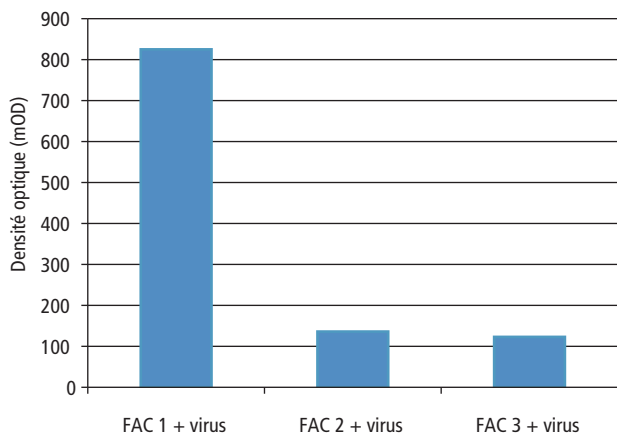


Figure 4 | Résultat d'un test ELISA réalisé avec plusieurs fragments d'anticorps (FAC) isolés par Phage display. Le FAC 1 reconnaît spécifiquement le virus de la petite cerise, alors que les FAC 2 et 3 ne le reconnaissent pas. Le FAC 1 pourra servir de base au développement d'un test diagnostique de la maladie de la petite cerise.

La maladie virale de la petite cerise

La maladie de la petite cerise, d'origine virale, complexe et encore mal connue, est associée à plusieurs virus filamenteux de la famille des *Closteroviridae* (Hadidi *et al.* 2011). Cette maladie virale a un impact négatif important sur la qualité de la récolte des arbres infectés. En effet, les variétés sensibles produisent des petites cerises, sans couleur et insipides, qui ne peuvent pas être commercialisées (fig. 3). D'autres symptômes sont le rougissement automnal précoce du feuillage et une diminution de la vigueur des arbres. La maladie se transmet par greffage et par des vecteurs naturels, les cochenilles. Cette maladie est difficile à diagnostiquer uniquement sur la base de symptômes. L'indexage, permettant de dépister les maladies d'origine virale, reste le moyen classique de diagnostic, cependant il demande plusieurs années d'étude. C'est pourquoi il est nécessaire de disposer d'outils de diagnostic fiables et rapides afin de lutter efficacement contre cette maladie. À l'aide de la technique du *Phage display*, des anticorps sont en cours de fabrication afin de développer un test de diagnostic rapide et spécifique de cette maladie. Plusieurs fragments d'anticorps ont déjà été sélectionnés et ces derniers sont capables de détecter la protéine de la capsid du virus (fig. 4).

À terme, le développement d'un test ELISA avec ce nouvel anticorps permettra d'accélérer le diagnostic et d'améliorer les connaissances sur la maladie de la petite cerise en Suisse.

Conclusions

Non seulement rapide et peu coûteuse, la technique du *Phage Display* offre un large spectre d'applications dans le développement d'outils de diagnostic en agronomie. Il n'est plus nécessaire de pouvoir enrichir ou de purifier le pathogène causal, étant donné la possibilité d'utiliser une protéine de la cible produite *in vitro*. La technique est donc applicable à de nombreux domaines autres que la virologie, comme la bactériologie ou la phytoplasmiologie (par exemple la maladie de la flavescence dorée de la vigne). Pour rappel, les phytoplasmes sont des organismes ne pouvant être cultivés *ex vivo*. Le *Phage Display* permet également d'isoler un anticorps dirigé contre une toxine ou toute autre cible potentiellement présente dans des denrées alimentaires. Il est théoriquement possible d'obtenir un anticorps contre n'importe quelle cible, faisant de cette technique un outil d'une puissance remarquable. ■

Bibliographie

- Clark M. F. & Adams A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
- De Boer S. H. & Lopez M. M., 2012. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 197–218.
- Engvall E. & Perlmann P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874.
- Geyer C. R., McCafferty J., Dubel S., Bradbury A. R. & Sidhu S. S., 2012. Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods Mol Biol* **901**, 11–32.
- Gugerli P., 1978. Detection of 2 Potato Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **92**, 51–56.
- Hadidi A., Barba M., Candresse T. & Jelkmann W., 2011. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. *American Phytopathological Society*. 429 p.
- Hairul Bahara N. H., Tye G. J., Choong Y. S., Ong E. B., Ismail A. & Lim T. S., 2013. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* **41**, 209–216.
- Ziegler A., Torrance L., Macintosh S. M., Cowan G. H. & Mayo M. A., 1995. Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library. *Virology* **214**, 235–238.